

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**ANÁLISE DA COMUNIDADE BACTERIANA DE ANIMAIS MARINHOS
RECOLHIDOS DO LITORAL NORTE DO RIO GRANDE DO SUL**

ALINE WEBER MEDEIROS

Orientador(a): Prof^(a). Dr^(a). Ana Paula Frazzon

Porto Alegre

Abril/2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**ANÁLISE DA COMUNIDADE BACTERIANA DE ANIMAIS MARINHOS
RECOLHIDOS DO LITORAL NORTE DO RIO GRANDE DO SUL**

Aline Weber Medeiros
Mestre em Microbiologia

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia
Molecular de Procariotos

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Paula Frazzon

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil

Abril/2016

CIP - Catalogação na Publicação

Weber Medeiros, Aline
ANÁLISE DA COMUNIDADE BACTERIANA DE ANIMAIS
MARINHOS RECOLHIDOS DO LITORAL NORTE DO RIO GRANDE
DO SUL / Aline Weber Medeiros. -- 2016.
97 f.

Orientadora: Ana Paula Guedes Frazzon.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Animais Marinhos. 2. Comunidade bacteriana. 3.
Sequenciamento de Nova Geração. 4. Enterococcus. 5.
PCR em tempo real. I. Guedes Frazzon, Ana Paula ,
orient. II. Título.

*Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).*

“Quando faltar sorte faça sobrar atitude, o azar morre de medo de
pessoas determinadas”

Autor Desconhecido

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as oportunidades que se concretizaram ao longo de meu caminho, principalmente pela oportunidade de conhecer e compartilhar bons momentos com pessoas valiosas.

Agradeço a minha família, a qual sempre apoiou e se orgulhou de minhas escolhas e que instigou o estudo como forma de desenvolvimento pessoal. Mesmo na distância sempre foram presentes em meu pensamento e coração.

Ao meu companheiro, Eduardo Rampelotto, pela compreensão em momentos de dificuldades, não só relacionadas a realização do doutorado, mas aos entraves da vida, também pelo carinho incondicional e às palavras de incentivo quando nem mesmo eu acreditava.

Agradeço à minha orientadora, Ana Paula Frazzon, pela credibilidade, paciência, apoio, por entender a humanidade de seus alunos e orientados, pela preocupação que sempre foi além das fronteiras do laboratório.

Agradeço as meninas do laboratório de Bioquímica de Procariotos, Luiza e Roberta, e ao professor Jeverson Frazzon por sempre me acolherem com simpatia e carinho, fazendo com que eu me sentisse em casa.

À toda equipe do CECLIMAR, pela atenção e concessão das amostras em especial ao Maurício Tavares e Derek Blaese.

Em todos esses anos muitas pessoas passaram pelo laboratório, e eu também passei por muitos laboratórios e todas essas pessoas de alguma forma contribuíram na minha jornada, e eu agradeço a todos pela convivência agradável que me proporcionaram.

Verdadeiras amigas foram cunhadas nesse período, e uma delas foi a Daniele Vargas, que me acompanha desde o mestrado me incentivando com suas palavras e que foi um dos pilares que me ajudou nessa saga. Além de um amiga, Tiane foi imprescindível na realização desse trabalho colaborando com seu conhecimento e suas palavras de esperança de que daria certo. Agradeço também as minhas maravilhosas colegas de grupo, Naiara, Rebeca e Janira. Mesmo de longe agradeço a Mica, que dividiu frustrações e anseios comigo e com isso eles se tornaram bem menores.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES- Fapergs) pela concessão da bolsa.

ANÁLISE DA COMUNIDADE BACTERIANA DE ANIMAIS MARINHOS RECOLHIDOS DO LITORAL NORTE DO RIO GRANDE DO SUL

Autor: Aline Weber Medeiros

Orientadora: Prof^(a). Dr^(a). Ana Paula Guedes Frazzon

RESUMO

O conhecimento sobre a microbiota de animais marinhos fornece uma base que pode ser usada para comparação em virtude de mudanças futuras, apesar disso pouco se sabe sobre a natureza das bactérias associadas com o intestino desses animais. Esse estudo visou a obtenção de um panorama sobre a microbiota de animais marinhos selvagens recolhidos no litoral do Rio Grande do Sul através de ferramentas independentes de cultivo, como o sequenciamento de última geração e PCR quantitativa em tempo real (qPCR), que permitem a inferência sobre as bactérias pertencentes a microbiota intestinal a partir do DNA genômico total obtido diretamente da amostra. A partir do sequenciamento parcial do gene de 16S rRNA utilizando a plataforma de alta desempenho Ion Torrent PGM, seis amostras fecais de lobo-marinho-sul-americano (*Arctocephalus australis*) e quatro lobo-marinho-subantártico (*Arctocephalus tropicalis*) foram avaliadas. Verificou-se que o filo Firmicutes (86,28%) foi mais frequente nas fezes de ambas as espécies, seguido por Actinobacteria (6,74%) e Proteobacteria (3,34%), sendo Bacteroidetes e Fusobacteria os filos menos frequentes. A qPCR foi empregada para quantificar as espécies de enterococos, mais frequentemente isoladas de fezes de animais (*Enterococcus faecalis*, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. faecium*, *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*), em amostras fecais de animais marinhos selvagens. A partir de DNAs totais isolados de 24 amostras fecais de lobos marinhos, tartarugas-verdes e aves marinhas, verificou-se que *E. faecalis* ($1,82 \times 10^{12}$ cópias/ng) foi a espécie mais frequente em todas as amostras analisadas e *E. hirae* ($5,89 \times 10^{10}$), *E. mundtii* ($7,57 \times 10^{10}$ cópias/ng), *E. faecium* ($4,94 \times 10^{09}$ cópias/ng), *E. casseliflavus* ($1,22 \times 10^{09}$ cópias/ng) e *E. gallinarum* ($3,84 \times 10^{10}$ cópias/ng) também demonstraram estar presentes na microbiota desses animais.

¹Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (98 p.) Abril, 2016.

ANALYSIS OF THE BACTERIAL COMMUNITY FROM MARINE ANIMALS FOUND IN THE COASTAL NORTH RIO GRANDE DO SUL¹

Author: Aline Weber Medeiros

Advisor: Prof. Dr. Ana Paula Guedes Frazzon

ABSTRACT

Knowledge about the marine animals microbiota provides a base that can be used for comparison due to future changes, nevertheless little is known about the nature of the bacteria associated with the animal gut. This study aimed to obtain an overview of the microbiota of wild marine animals collected in the Rio Grande do Sul coast using cultivate independent methods, as the next-generation sequencing and quantitative real-time PCR (qPCR), which allow the inference about the bacteria belonging to the intestinal microbiota from total genomic DNA obtained directly from the sample. Using the high performance Ion Torrent PGM platform six fecal samples of South American fur seal (*Arctocephalus australis*) and four Subantartic fur seals (*Arctocephalus tropicalis*) were evaluated. It was found that the phylum Firmicutes (86.28%) was more common in faeces of both species, followed by Actinobacteria (6.74%) and Proteobacteria (3.34%), Fusobacteria and Bacteroidetes were the least frequent. The qPCR was used to quantify the Enterococci species commonly isolated from faecal samples of animal (*Enterococcus faecalis*, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. faecium*, *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*) in faecal samples or cloacal swabs / rectal wild marine animals. From total DNA isolated of 24 fecal samples from sea lions, green turtles , sea birds, it was observed that *E. faecalis* (1.82×10^{12} copy/ng) was the most common species in all samples analyzed and *E. hirae* (5.89×10^{10}), *E. mundtii* (7.57×10^{10}), *E. faecium* (4.94×10^{09}), *E. casseliflavus* (1.22×10^{09}) and *E. gallinarum* (3.84×10^{10}) also shown to be present in the microflora of these animals.

¹Doctoral Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (98 p.) April, 2016.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	3
2.1	Objetivo Geral.....	3
2.2	Objetivos Específicos	3
3.	REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1	Microbiota Intestinal.....	4
3.2	<i>Enterococcus</i> sp	7
3.3	Enterococcus no Ambiente Marinho	8
3.4	Mamíferos Marinhos	10
3.4.1	Lobo-marinho-sul-americano (<i>Arctocephalus australis</i>)	12
3.4.2	Lobo-marinho-subantártico (<i>Arctocephalus tropicalis</i>).....	14
3.5	Aves Marinhas.....	15
3.5.1	Pinguim de Magalhães (<i>Spheniscus magellanicus</i>)	15
3.5.2	Aves Migratórias	17
3.6	Tartaruga verde (<i>Chelonia mydas</i>)	18
4.	ARTIGOS	21
4.1.	Artigo 1	21
4.2.	Artigo 2	52
5.	DISCUSSÃO GERAL	75
6.	CONCLUSÃO	79
7.	REFERÊNCIAS	80
8.	Apêndices	85

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Espécies de lobos-marinhos já encontradas no litoral do RS.....	12
Figura 2 Pinguins de Magalhães encontrados no litoral do RS.....	17

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CFU	Unidade formadora de Colônia
IUCN	União Internacional para a Conservação da Natureza
OTU	Unidade taxonômica operacional
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

1. INTRODUÇÃO

Animais marinhos como focas, leões marinhos, lobos marinhos, baleias, e aves marinhas, são animais frequentemente encontrados na zona costeira durante o período migratório. Estes animais se alimentam principalmente de peixes e algas. Pouco se sabe sobre a natureza das bactérias associadas com a superfície e com o intestino desses animais. A caracterização da microbiota no intestino de animais tem sido fundamental no avanço da compreensão da relação entre o hospedeiro e microrganismo.

Uma grande parte dos microrganismos existentes não é capaz de crescer nos meios de cultivo tradicionais. Embora a parcela de microrganismos ditos como cultiváveis varie entre os diferentes tipos de amostra, sabe-se que a recuperação da diversidade é muito baixa, desse modo o conhecimento sobre a ecologia microbiana na maior parte dos ecossistemas é pouco conhecida, sendo que microrganismos associados a animais marinhos são nichos ainda menos estudados. Além disso, estudos de diversidade bacteriana utilizando o cultivo devem atentar para diversos fatores que impeçam que bactérias em maior número ou melhor adaptáveis às condições de crescimento, sobreponham bactérias fastidiosas e de crescimento mais lento.

O desenvolvimento de técnicas independentes de cultivo e a popularização do sequenciamento de nova geração vêm expandindo a capacidade de análise da diversidade microbiana presente em uma grande gama de ambientes. Essas técnicas já vêm sendo empregadas, por exemplo, na análise comparativa da comunidade microbiana de indivíduos saudáveis e doentes, para a determinação da dieta de animais através da análise de fezes ou conteúdo intestinal, na averiguação

da poluição ambiental, entre outros.

Dentre as abordagens independentes de cultivo está o sequenciamento de última geração do gene *16S rRNA* que permite a identificação de microrganismos em uma cultura mista. O gene *16S rRNA* é muito conservado entre os domínios Bacteria e Archaea e a identificação taxonômica é possível devido a presença de nove regiões hipervariáveis com informações para classificar os microrganismos. Essas regiões são flanqueadas por regiões conservadas permitindo a amplificação desse fragmento utilizando oligonucleotídeos iniciadores universais. Essa técnica é baseada na amplificação de um pequeno fragmento de DNA que permite inferências sobre a diversidade microbiana presente na amostra.

A prevalência dos diferentes filos bacterianos e de enterococos nos mais diversos ambientes tem sido bastante estudada e documentada. Entretanto o estudo sobre a microbiota em fezes de animais selvagens associados ao ambiente marinho não é muito noticiada, provavelmente, devido à dificuldade em se obter amostras desses animais. Nesse sentido, o presente estudo examinou a composição dos filos e do gênero enterococos em fezes de mamíferos marinhos, tartarugas marinhas e aves marinhas capturadas no litoral norte do Rio Grande do Sul, com o objetivo de construir um panorama da microbiota desses animais que pode permitir comparações futuras frente a mudanças ambientais além de fornecer informações sobre a existência de possíveis patógenos presentes nesses animais que possam representar riscos durante sua manipulação.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a diversidade bacteriana em amostras fecais coletadas de animais marinhos selvagens encontrados no litoral norte do Rio Grande do Sul.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1. Caracterizar as populações microbianas de lobos marinhos da espécie *Arctocephalus tropicalis* e *Arctocephalus australis* utilizando sequenciamento de nova geração.

2.2.2. Avaliar a presença das espécies mais prevalentes de *Enterococcus* em fezes de lobos marinhos, aves marinhas e tartarugas marinhas, utilizando a técnica de PCR em tempo real quantitativa.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Microbiota Intestinal

A microbiota intestinal é definida como a população total de espécies microbianas que habitam o trato digestivo, sendo um importante contribuinte para a digestão e utilização de alimentos no trato gastrointestinal. Além disso, exercem inúmeras funções benéficas para o hospedeiro, como a geração de energia, regulação da imunidade e auxilia na maturação celular (Hand *et al.* 2013).

A presença de uma densa comunidade bacteriana no trato gastrointestinal, geralmente entre 10^{12} organismos por mililitro, previne o estabelecimento de microrganismos patogênicos, o que é chamado de “interferência microbiana”, sendo que a perda da integridade da microbiota aumenta a susceptibilidade a infecções entéricas (Stecher & Hardt, 2008).

Estima-se que mais de 400 espécies possam ser encontradas compondo a microbiota de mamíferos, sendo a maioria anaeróbia. A alta concentração de microrganismos associada à grande parcela de anaeróbios, dificultam a caracterização da microbiota do trato gastrointestinal através de métodos de cultivo tradicionais. Estima-se que somente 10-40% da microbiota do trato gastrointestinal seja cultivável (Hand *et al.* 2013, Zoetendal *et al.* 2004).

Vários fatores podem influenciar na composição da microbiota, embora existam tendências gerais quanto à microbiota dentro de determinada espécie, principalmente no que diz respeito a filos. Entretanto variações significativas na composição têm sido determinadas dependentes de diversos fatores, como dieta, morfologia do hospedeiro, filogenia entre outros (Kostic *et al.* 2013, Ley *et al.* 2008).

A dieta é um dos fatores considerados mais importantes na determinação

do microbioma intestinal, ela tem um forte impacto no ambiente intestinal, incluindo o tempo de trânsito e pH (Scott *et al.* 2013). A variação na ingestão dos três macronutrientes principais (hidratos de carbono, proteínas e gorduras) influenciam no tipo e abundância dos metabólitos disponíveis para a microbiota do trato gastrointestinal (Yeoman *et al.* 2011). Animais em cativeiro são submetidos a uma dieta que é considerada “não natural” e esse é um, dentre vários fatores, que modificam a microbiota desses animais (Nelson *et al.* 2013).

Além de mudanças no padrão de alimentação, animais em cativeiro também podem apresentar diferenças na microbiota quando comparados com animais em seu habitat natural, devido a limitação do comportamento social com outros animais de sua espécie, além da administração de antimicrobianos. Nelson *et al.* (2013) analisaram a microbiota de leopardos marinhos selvagens e em cativeiro demonstrando consideráveis diferenças, como a maior presença do filo Proteobacteria nos animais marinhos selvagens do que em cativeiro.

Pode haver também diferenças na microbiota relacionadas ao sexo do animal, Nelson *et al.* (2013) demonstraram diferenças significativas entre machos e fêmeas de elefantes marinhos do sul, embora não tenha observado o mesmo com leopardos marinhos. As diferenças associadas ao sexo do animal podem ser devido a padrões de alimentação distintos, resultantes de diferenças fisiológicas que levam a mergulhos com diferentes profundidades e acesso a diferentes tipos de presas.

A filogenia do hospedeiro é outro fator que afeta a microbiota e vêm sendo apontado como um fator ainda mais marcável no microbioma do que a dieta, um exemplo são os pandas gigante e vermelho, que apresentam dietas carnívoras e herbívoras, mesmo assim sua microbiota é mais relacionada entre si do que com outros carnívoros ou herbívoros, respectivamente (Yeoman *et al.* 2011).

O segmento intestinal de coleta do material tem grande influência na contagem nos microrganismos presentes e sua quantidade. Nelson *et al.* (2013) através da análise da microbiota de leopardos marinhos demonstraram diferenças significativas entre a comunidade microbiana do trato gastrointestinal superior (duodeno, jejuno e íleo) e da microbiota fecal, embora pouca diferença tenha sido observada entre a microbiota da parte final do intestino (cólon e reto) e da microbiota fecal. O aumento da comunidade bacteriana entre o cólon, reto e fezes sugere que amostras de material fecal fornecem uma indicação da comunidade bacteriana presente ao longo de todo o intestino desses animais (Walter & Ley 2011). As diferenças microbianas entre os segmentos intestinais se dá por diferenças anatômicas próprias de cada sítio, mudanças de pH ao longo do trato gastrointestinal, pela presença de enzimas diferentes e outros compostos (Walter & Ley 2011).

A idade também é um fator com forte influência na microbiota. Em mamíferos, os microrganismos são adquiridos inicialmente durante o processo de nascimento. Durante seu desenvolvimento, a microbiota intestinal dos mamíferos torna-se cada vez mais diversificada durante a mudança na dieta do leite da mãe para o alimento sólido (Kostic *et al.* 2013). Smith *et al.* (2013) avaliaram diferenças na microbiota de lobos-marinhos australianos (*Arctocephalus pusillus doriferus*) relacionadas a idade, sendo avaliados animais com 2 meses, 9 meses e adultos, embora o filo Firmicutes tenha se mostrado predominante durante os diferentes estágios houveram variações nas classes dominantes.

Além desses fatores, outros podem implicar em variações na composição da microbiota, como o padrão de migração. Estudos especificamente voltados para humanos também demonstram que fatores como: estado de saúde, mudanças

alimentares também tem influência no microbioma do trato gastrointestinal (Nelson *et al.* 2013).

3.2. *Enterococcus* sp.

O gênero *Enterococcus* constitui um diverso, complexo e importante grupo de bactérias muito adaptada à diversos ambientes e capazes de sobreviver à condições adversas, o que faz com que tenham uma ampla distribuição, sendo comumente encontrados no trato gastrintestinal de humanos e animais, solo, água e alimentos (Gilmore *et al.* 2014, Giraffa 2002).

Microscopicamente, *Enterococcus* são cocos Gram-positivos que se dispõem em pares ou cadeias curtas, não formadores de esporos. Pertencem ao grupo de organismos conhecidos como bactérias ácido lácticas (BAL) produtoras de bacteriocinas. Não possuem enzima citocromo, e embora sejam catalase negativos, podem produzir pseudo-catalase com uma fraca efervescência durante o teste (Fisher & Phillips 2009, Murray 1990). Enterococos toleram condições ambientais adversas, como uma ampla faixa de temperatura (entre 5°C e 50°C), altas concentrações de NaCl (6,5%), variações de pH (4,6 a 9,9), além de serem resistentes à presença de sais biliares (40%). Tais características, aliadas à capacidade de adquirir uma grande variedade de genes de resistência aos antimicrobianos tem contribuído para a alta incidência desses microrganismos nas infecções adquiridas no hospital, tornando-os um desafio na área clínica (Fisher & Phillips 2009).

As espécies *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* são comumente encontradas no trato gastrintestinal de humanos e animais, enquanto *E. mundtii* e *E. casseliflavus* são mais frequentes em plantas e vegetais. Outras

espécies também podem ser isoladas em alimentos como *E. durans*, *E. avium* e *E. raffinosus*. No âmbito clínico, *E. faecalis* é a espécie dominante, o que pode estar relacionado aos fatores de virulência associados à esta espécie (Fischer & Phillips 2009, Klein 2003).

O gênero *Enterococcus* tem sua relevância clínica baseada não somente na sua crescente prevalência nas últimas décadas, mas também no elevado índice de linhagens resistentes aos antimicrobianos. Essa característica reforça sua persistência em ambientes hospitalares, já que o uso de antibióticos em tais ambientes suprime microrganismos susceptíveis fornecendo uma vantagem seletiva para as bactérias resistentes (Gilmore *et al.* 2014).

Enterococos são resistentes intrinsecamente a penicilinas semisintéticas, cefalosporinas, baixos níveis de aminoglicosídeos e clindamicina. Além disso, também possuem a capacidade de aquisição de genes de resistência, o que pode ocorrer por conjugação ou mutações no DNA apresentando resistência adquirida à antibióticos como cloranfenicol, eritromicina, clindamicina e aminoglicosídeos, tetraciclina, fluoroquinolonas e vancomicina (Kayser 2003).

3.3. *Enterococcus* em ambientes marinhos

A contaminação microbiana do ambiente marinho decorre principalmente por meio de efluentes urbanos. Segundo Islam (2004) o maior volume de água recebido pelo ambiente marinho consiste de esgoto, contendo resíduos industriais e domésticos, restos de animais e resíduos de matadouros. Além de patógenos, esse descarte carrega consigo substâncias orgânicas, metais pesados e outros contaminantes (Fleming *et al.* 2006).

O aumento da densidade populacional humana nas costas, atividades

como a agricultura e o uso de medicamentos são fatores que podem levar a distúrbios no ambiente marinho. A prospecção de patógenos associado a uma população marinha enfraquecida, perda de habitat, aumento da predação, mudanças climáticas e poluição, podem levar a doenças com a capacidade de dizimar uma espécie. Por outro lado, animais selvagens também podem ser hospedeiros de potenciais patógenos humanos (Bogolmoni *et al.* 2008).

Enterococcus têm sido usados como um dos indicadores de contaminação de águas marinhas de acordo com recomendações da Agência de proteção ambiental dos EUA (USEPA, 1986). Porém a interpretação da presença de enterococos vem sendo questionada, uma vez que esse microrganismo têm sido encontrado em águas onde, aparentemente, não há contaminação com esgoto. Além disso, enterococos são capazes de se multiplicar em águas quentes tropicais. Em 1999, a USEPA, afirmou que os atuais indicadores de contaminação fecal poderiam ser usados em águas subtropicais, porém deveria haver uma busca por indicadores específicos para águas tropicais (Fleming *et al.* 2006).

No Brasil, Oliveira *et al.* (2008) demonstraram uma elevada densidade de *Enterococcus* na água do mar e areia de duas praias brasileiras com diferentes índices de poluição. A praia com maior índice de poluição também demonstrou maior contaminação por enterococos e maior prevalência de linhagens resistentes, tanto na água do mar quanto na areia.

A presença de *Enterococcus* em animais relacionados a ambientes marinhos não é muito documentada. Recentes estudos utilizando métodos de cultivo tradicionais determinaram a distribuição desse gênero em mamíferos, tartarugas e aves marinhas. Santestevan *et al.* (2015) avaliaram a presença de *Enterococcus* em fezes de lobos marinhos subantártico e lobos marinhos do sul selvagens, onde *E.*

faecalis e *E. hirae* foram as espécies mais prevalentes. Também foi verificado em seu estudo a presença de resistência a antimicrobianos e determinantes genéticos de virulência e resistência. Prichulla *et al.* (2016) demonstraram a presença de *Enterococcus* em amostras fecais de animais marinhos selvagens, como aves, tartarugas e mamíferos, onde também foi observada a presença de genes de virulência e resistência. A presença de determinantes de resistência direciona para dois possíveis aspectos: o impacto da atividade humana no ambiente marinho e o resistoma, que aponta para o fato de que ambiente selvagem possa ser um reservatório de determinantes de resistência, já que eles podem ser constituintes naturais de microrganismos não patogênicos (Wright *et al.* 2007).

3.4. Mamíferos Marinhos

Os mamíferos marinhos são classificados em três ordens: ordem *Cetacea*, que agrupa as baleias e os golfinhos, *Serinea* que agrupa peixes-bois e dugongos e a ordem *Carnivora* a qual pertencem as lontras e ursos polares e os membros da subordem *Pinnipedia* (Silva *et al.* 2014).

A subordem *Pinnipedia* inclui 34 espécies distribuídas em três famílias: *Otariidae* (lobo marinho e leão marinho), *Phocidae* (foca e elefante marinho) e *Odobenidae* (morsas). O termo Pinípede tem origem no formato dos membros posteriores dos animais, que são constituídos por nadadeiras (pina=pena; podos=pés), com dedos compridos e unidos por membranas (Silva *et al.* 2014). Esses animais são mamíferos e alternam parte de sua vida no mar e parte em terra (Colares *et al.* 1999, Geraci 2005), realizando etapas como reprodução, troca de pelos e descanso em terra ou gelo, mas também passando grande parte de seu desenvolvimento no mar, se alimentando ou se deslocando (Higdon *et al.* 2007;

Oliveira 2013).

Podem ser encontrados em todos os oceanos do mundo, sendo mais numerosos nas águas frias das regiões Ártica e Antártica (Silva *et al.* 2014). Os pinípedes chegam ao litoral do Rio Grande do Sul no inverno quando há maior influência da Corrente das Malvinas que faz com que cheguem a costa águas mais frias. Na costa brasileira há registros de ocorrência de sete espécies: o leão-marinho-do-sul (*Otaria flavescens*), o lobo-marinho-sul-americano (*Arctocephalus australis*), o lobo-marinho-antártico (*Arctocephalus gazella*), o lobo-marinho-subantártico (*Arctocephalus tropicalis*), a foca-caranguejeira (*Lobodon carcinophagus*), a foca-leopardo (*Hydrurga leptonyx*) e elefante-marinho-do-sul (*Mirounga leonina*). Sendo que todas as espécies relatadas no Brasil também possuem registros de ocorrência no Rio Grande do Sul, porém os animais registrados com maior frequência no litoral norte do Rio Grande do Sul são indivíduos adultos de leão-marinho-do-sul e, principalmente, jovens de lobo-marinho-sul-americano. A espécie de lobo-marinho que aparece com maior frequência no litoral rio grandense é *Arctocephalus australis* (lobo-marinho-sul-americano) embora já tenha sido registrada a ocorrência de outras duas espécies, *A.tropicalis* (lobo-marinho-subantártico) e *A.gazella* (lobo-marinho-antártico) (Ceclimar 2014) (Figura 1).

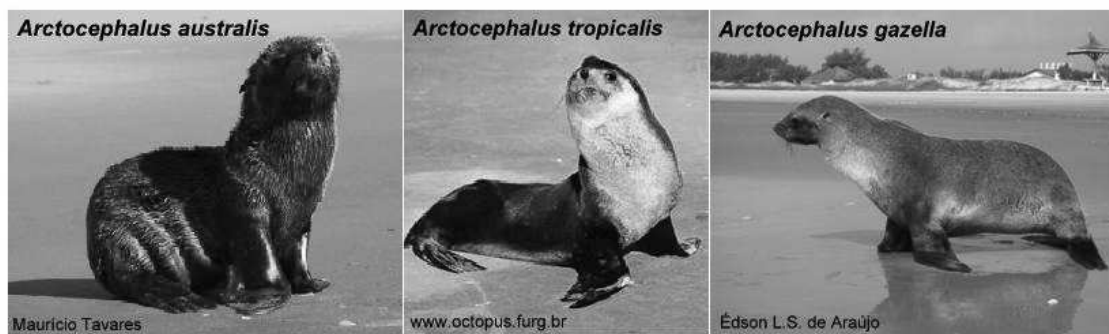


Figura 1: Espécies de lobos-marinhos já encontradas no litoral do Rio Grande do Sul. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/ceclimar/ceram/fauna-marinha-e-costeira/lobo-marinho>

3.4.1. Lobo-marinho-sul-americano (*Arctocephalus australis*, Zimmermann, 1783)

Popularmente conhecido como lobo-marinho-sul-americano, é um Pinípede da família *Otariidae* de corpo delgado e coloração variando de negra a marrom, com tons cinza-prateado. Apresentam pelagem dupla, ou seja, uma camada superior com pelos escuros e grossos e abaixo pelos mais claros, curtos e macios (Silva *et al.* 2014 , Vaz Ferreira 1987). Os machos alcançam em média 1,90 a 2,0 metros e 160 a 180 Kg e as fêmeas 1,40 a 1,50 metros variando de 50 a 60 kg (Vaz Ferreira 1987).

A alimentação do lobo-marinho-sul-americano é composta basicamente por peixes, crustáceos diversos, cefalópodes e outros invertebrados marinhos (Silva *et al.* 2014).

Esses animais são encontrados desde o Rio de Janeiro, no Oceano Atlântico, até a Península de Paracas (Peru), no Oceano Pacífico, ocorrendo também nas ilhas Malvinas (Silva *et al.* 2014). Estima-se que a população média seja entre 350.000 a 400.000 exemplares, estando a maioria da população global concentrada no Uruguai (200.000-250.000 animais), onde 55 % da população é encontrada na Ilha dos Lobos (cerca de 180.000 animais; com 35.000 filhotes

nascidos por ano). Os animais restantes são distribuídos na área de Cabo Polonio e Ilha de la Coronilla. São também encontrados nas Malvinas cerca de 15 - 20.000 animais, e ao longo da costa da Patagônia argentina cerca de 20.000 animais. A população do Chile é estimada em 30 000 lobos e a peruana foi estimada em 11.400 durante um ano de *El Niño*, que é um evento climático que afeta drasticamente a distribuição da população de lobos (Sielfeld 1999)

Durante o verão do Hemisfério Sul (entre novembro e janeiro), estes animais se reúnem nas colônias reprodutivas localizadas, principalmente, em ilhas no Uruguai, Argentina, Ilhas Malvinas, Chile e Peru. A migração dos lobos marinhos sul-americanos é influenciada pelas correntes marítimas e pelo seu hábito pelágico, que promove deslocamento, principalmente de jovens (de ambos os sexos) fora do período reprodutivo, em busca de comida, eventualmente culminando em paradas em terra para descanso de alguns destes animais (Oliveira 2013, Rocha-Campos *et al.* 2011). No Rio Grande do Sul, as Unidades de Conservação (Refúgio da Vida Silvestre) Ilha dos Lobos, em Torres, e Molhe Leste da Lagoa dos Patos, em São José do Norte, são as principais áreas de concentração invernal (Oliveira 2013, Rocha-Campos *et al.* 2011). Estima-se que a mortalidade desses animais no litoral do Rio Grande do Sul seja em torno de 260 animais/ano, sendo a maioria entre julho e outubro. Pelo fato da espécie ter pouca interação negativa com a pesca considera-se que a maior parte dos animais mortos seja resultado de um fenômeno natural. Como a maioria dos animais encontrados são jovens em época de desmame e a ocorrência culmina após fenômenos meteorológicos associados à entrada de frentes frias oriundas do sul do continente, acredita-se que as fortes ondulações no mar causadas por esses fenômenos poderia dificultar a alimentação desses animais resultando em debilidade, enfraquecimento e conseqüente morte (Silva *et al.* 2014)

Embora tenha sido um dos pinípedes que mais sofreu com a caça desde o século XVI até 1991, quando a pesca era permitida em países como o Uruguai tem sua extinção considerada de baixo risco, segundo a Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN, 2013). Atualmente, encontra-se protegida ao longo de toda a sua distribuição geográfica (Oliveira 2013, Rocha-Campos *et al.* 2011).

3.4.2 Lobo-marinho-subantártico (*Arctocephalus tropicalis*, Gray 1872)

É caracterizado pela coloração pardo-amarelada de sua pelagem no peito, garganta e face, apresentando também uma mecha de pelos no alto da cabeça (Silva *et al.* 2014). Os machos alcançam em média 1,95 metros e 165 Kg e as fêmeas 1,45 metros e 145 kg em fêmeas. A maturidade sexual desses animais se dá por volta dos 4 a 8 anos em machos e 4 a 6 anos em fêmeas. A reprodução é terrestre e ocorre entre novembro e dezembro em ilhas subantárticas. A gestação dura 12 meses e o período de amamentação é de 10 meses. Alimenta-se principalmente de peixes, crustáceos, pinguins e cefalópodes (IUCN 2015).

Em 2000, a população mundial de lobos-marinho-subantártico foi estimada em mais de 400.000. Essa espécie procria em numerosos sítios em 8 ilhas ou grupo de ilhas. Aproximadamente 63% dos nascimentos de filhotes está concentrado na Ilha de Gough, um ponto remoto situado no Oceano Atlântico (Bester *et al.* 2006), 25% nas ilhas de Prince Edward (Hofmeyr *et al.* 2006, Bester *et al.* 2009) e 11% na ilha de Amsterdam (Guinet *et al.* 1994). Apesar de haver ocorrência ao longo de toda a costa brasileira, alguns autores sugerem que a presença desta espécie possa estar associada a alguns fenômenos climáticos, como o *El Niño* e o *La Niña* (Oliveira 2013).

Ao longo dos anos observa-se acentuada variação no número de exemplares que ocorrem nas praias do Rio Grande do Sul, na maioria dos anos são encontrados entre 3 a 7 exemplares por ano, havendo anos sem registros de ocorrência (Silva *et al.* 2014). Porém em 2006 foram registrados 26 exemplares na costa. A maior ocorrência se dá com a chegada do inverno entre os meses de julho e setembro. Os animais que chegam a costa estão na maioria vivos, mas bastante debilitados em função de exaustão, má alimentação, podendo ocorrer a presença de parasitas e enfermidades (Silva *et al.* 2014).

Considerado de baixa preocupação pela Lista Vermelha da IUCN (2013) para espécies ameaçadas de extinção, *A.tropicalis*, da mesma forma que *A.australis*, enfrentou maiores problemas de conservação no passado, relativos à pesca, estando atualmente legalmente protegida (Oliveira 2013).

3.5. Aves marinhas

3.5.1. Pinguim de Magalhães (*Spheniscus magellanicus*, Forster 1781)

As aves marinhas podem ser definidas como “espécies de aves que vivem e sobrevivem a partir do meio ambiente marinho” (Schreiber & Burger 2002). Os pinguins são as aves marinhas mais bem adaptadas, sendo que no seu período evolutivo perderam a capacidade de voar. O pinguim de Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) se reproduz em colônias numerosas distribuídas pela Argentina, Ilhas Malvinas e Chile. Anualmente, durante o outono e inverno, com o auxílio de correntes marinhas frias, como a corrente das Malvinas, realiza movimentos migratórios para o Brasil em busca de regiões com maior disponibilidade de presas (Mäder 2010).

O pinguim de Magalhães alcança cerca de 70 cm de comprimento e 4-5

kg de peso e sua longevidade varia entre 8 e 10 anos. A maturidade sexual é alcançada pelas fêmeas entre 4-5 anos de idade e pelos machos entre 6-7 anos. Os juvenis possuem partes dorsais do corpo de cor preta acinzentada, partes ventrais brancas e a cabeça branca com a fronte, a coroa e a nuca pretas. Os adultos possuem coloração semelhante aos juvenis, mas com queixo, garganta e bochechas pretas, além de uma lista preta contínua sobre o peito (Figura 2). Uma característica marcante dessa espécie é a faixa branca formada na região dos olhos e que se estende até o pescoço do animal quando adulto (IUCN 2015, Vanstreels *et al.* 2012).

A dieta dos pinguins do gênero *Spheniscus* consiste principalmente em peixes, e é complementada com cefalópodes e plâncton (Linhares 2005). Esses animais acumulam grandes reservas de tecido adiposo branco e proteínas, sendo capazes de armazenar também grandes quantidades de alimento não digerido no estômago já que durante sua permanência nas colônias para reprodução e troca de plumagem os pinguins passam por longos períodos sem alimentação (Dewar 2012).

Estima-se que a população seja 1,3 milhões de pares reprodutores, sendo que 950 mil estariam ao longo da costa Argentina, pelo menos 100 mil nas ilhas Malvinas e 200 mil no Chile, porém um declínio da população vem sendo observado nas últimas três gerações de pinguins (27 anos) (IUCN 2015).

A grande incidência de mortalidade de pinguins de Magalhães na costa brasileira, principalmente no Rio Grande do Sul e Santa Catarina se dá devido ao enfraquecimento natural e problemas de saúde, sendo esses animais, de certo modo, um excedente populacional (Petry 2012).

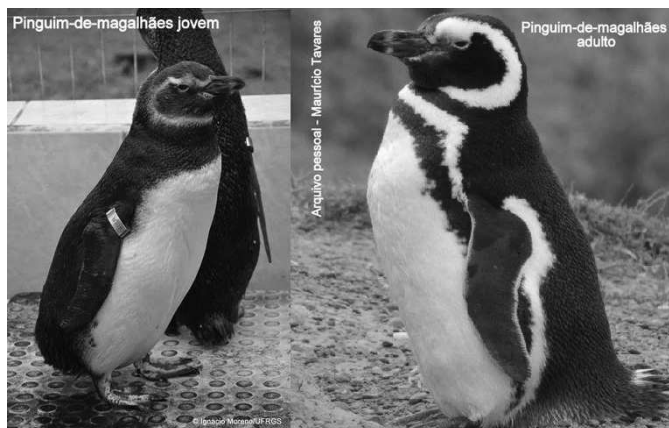


Figura 2: Pinguins de Magalhães encontrados no litoral do Rio Grande do Sul. Disponível em <http://www.ufrgs.br/ceclimar/ceram/fauna-marinha-e-costeira/pinguim-de-magalhaes>

3.5.2. Aves Migratórias

Embora existam grandes deficiências no acompanhamento das demais aves marinhas no litoral brasileiro, segundo Müller (2013) houve a ocorrência de 44 espécies de aves no litoral norte do Rio Grande do Sul, sendo destas, 10 espécies visitantes sazonais oriundas do hemisfério norte, 3 oriundas do hemisfério sul e 31 residentes. As famílias de aves mais representativas são *Ardeidae*, *Sternidae*, *Charadriidae* e *Scopolacidae* (Müller 2013).

As populações de aves migratórias que frequentam a costa gaúcha apresentam flutuações quanto ao número de espécies e de indivíduos durante o ciclo migratório. Algumas espécies, que não atingiram a maturidade reprodutiva, permanecem nas praias durante todo o ano, somente voltando às áreas de reprodução quando aptos a nidificarem (Alves 2007, Mäder 2011).

O litoral norte do Rio Grande do Sul por ser composto de uma faixa de dunas e por grandes trechos de banhados propicia ótimas condições para as aves migratórias e aquáticas. O cronograma de chegada das aves nas suas "áreas de condicionamento" é ajustado para coincidir com picos de recursos alimentares (Mäder 2011).

Durante o verão há uma redução da densidade de aves no litoral norte, o que tem sido relacionado com a grande ocupação pela população humana flutuante, pois no outono há um acréscimo de aves migrantes no local coincidindo com a diminuição de veranistas. Reforçando esta hipótese tem sido observada uma maior quantidade de indivíduos no Litoral Médio durante o verão que é considerado um local menos perturbado com mais de 9.000 migrantes do norte. Uma vez que a presença de pessoas nesta área torna-se frequente, o local perde sua funcionalidade para as aves, apesar da disponibilidade de alimento (Mäder 2011).

3.6. Tartaruga-verde (*Chelonia mydas*)

A tartaruga marinha *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) é conhecida popularmente como tartaruga-verde. São animais grandes, que atingem cerca de 1,2 m de comprimento da carapaça e que podem pesar aproximadamente 230 kg. A tartaruga verde apresenta ciclo de vida longo, com maturação sexual entre 26 e 40 anos. Embora seja um animal tipicamente solitário pode, ocasionalmente, formar agregações em áreas de alimentação (IUCN 2015).

São onívoras durante os primeiros anos de vida, consumindo preferencialmente alimento de origem animal, após este primeiro estágio, estes animais tornam-se predominantemente herbívoros. As tartarugas-verdes alimentam-se principalmente de monocotiledôneas marinhas e de algas, todavia também consomem matéria animal, particularmente águas-vivas e esponjas (Nakashima 2008).

A tartaruga-verde tem uma distribuição global, ocorrendo em águas tropicais e em menor frequência em águas subtropicais. Esses animais são altamente migratórios e realizam movimentos complexos de migração através de

sítios geograficamente distantes. Acredita-se que as tartarugas verdes habitem as águas costeiras de 140 países (IUCN 2015).

As principais áreas prioritárias de desova no Brasil estão localizadas em ilhas oceânicas: Ilha da Trindade, Estado do Espírito Santo, (Moreira *et al.* 1995), Atol das Rocas, Estado do Rio Grande do Norte (Bellini *et al.* 1996, Grossman *et al.* 2003) e Fernando de Noronha, Estado de Pernambuco (Bellini *et al.* 1996), também ocorrendo deposição de ovos no litoral norte do estado da Bahia. Esporadicamente, ocorrem ninhos nas praias dos estados do Espírito Santo, Sergipe e Rio Grande do Norte. Embora a zona de desova desses animais esteja principalmente localizada na região norte e nordeste do país, o litoral do Rio Grande do Sul é considerado uma área de importância para alimentação e desenvolvimento de *C. mydas* (Monteiro 2004). Como esta espécie possui grande atividade migratória, as fêmeas migram das áreas de alimentação e descanso para as áreas de reprodução, em deslocamentos que podem chegar a mais de 1.500 Km.

Segundo a IUCN 2015 há um declínio extenso da população de tartarugas-verdes em todas as grandes bacias oceânicas, ao longo das últimas três gerações, como resultado da exploração dos ovos e fêmeas adultas em praias de nidificação, jovens e adultos em áreas de forrageamento e mortalidade incidental relacionadas com a pesca marinha, degradação dos habitats marinhos e de nidificação. As análises de mudanças em 32 sítios distribuídos globalmente mostram um declínio de 48% a 67% no número de fêmeas adultas que nidificam anualmente durante as últimas 3 gerações.

O aumento da atividade pesqueira nos últimos anos é considerado a principal ameaça para a população de *C. mydas*, atingindo diretamente a população de juvenis (Sales *et al.* 2007). Também há um impacto humano negativo sobre os

habitats das tartarugas marinhas, relacionado a fatores ligados ao desenvolvimento costeiro desordenado como a movimentação da areia da praia (extração de areia e aterros); fotopoluição; tráfego de veículos; presença humana nas praias; portos, ancoradouros e molhes; ocupação da orla (hotéis e condomínios) e a exploração (produção e distribuição) de óleo e gás.

O aumento global da temperatura na ordem de 2°C também é um fator que compromete a população de tartarugas, uma vez que a temperatura desempenha um papel importante na determinação do sexo dos embriões podendo levar toda uma população à feminização. Além disto, mudanças de disponibilidade de recursos alimentares, de circulação de correntes marinhas e ventos podem comprometer seu longo e complexo ciclo de vida (Poloczanska *et al.* 2009). Diferentes formas de poluição também constituem uma ameaça para os habitats marinhos e terrestres das tartarugas marinhas, incluindo o som, temperatura, luz, plásticos, produtos químicos, efluentes e outros (Hamann *et al.* 2010).

No Rio Grande do Sul, a mortalidade de tartarugas marinhas tem sido atribuída a duas causas principais: a captura incidental em materiais de pesca, redes de arrasto, emalhe e espinhéis e a ingestão de materiais de origem antropogênica, como plásticos e cordas (Almeida 2011, Barros 2007).

4. ARTIGOS

4.1. Artigo 1

Título: Characterization of the faecal bacterial community of wild young South American (*Arctocephalus australis*) and Subantarctic fur seals (*Arctocephalus tropicalis*).

Publicado na FEMS Microbiology Ecology

DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/femsec/fiw029>, Fevereiro 2016

Characterisation of the faecal bacterial community of wild young South American (*Arctocephalus australis*) and Subantarctic fur seals (*Arctocephalus tropicalis*).

Aline Weber Medeiros¹, Adriana Giongo², Fernanda Pedone Valdez³, Derek Blaese de Amorin⁴, Maurício Tavares⁴, Pedro Alves d’Azevedo⁵, Ana Claudia Franco¹, Jeverson Frazzon⁶, Ana Paula Guedes Frazzon^{1*}

¹. Microbiology, Immunology and Parasitology Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

². Institute of Petroleum and Natural Resources, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

³. Molecular Genomics Biology Laboratory, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁴. Center for Coastal Studies, Limnology and Marine (Ceclimar), Federal University of Rio Grande do Sul, Imbé, RS, Brazil

⁵. Gram Positive Coccus Laboratory, Federal University of Health Sciences Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

⁶. Department of Food Science, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Running Title: Microbiota of South American and Subantarctic fur seals.

Key-words: 16S rRNA sequencing, faecal bacterial community, wild fur seals.

ABSTRACT

The microbiota of wild marine mammals is poorly understood, perhaps due to the migratory habits of some species and the difficulty in obtaining samples. Using high-throughput sequencing, the present study examines the faecal bacterial community of wild young South American (*Arctocephalus australis*) and Subantarctic fur seals (*Arctocephalus tropicalis*). Faecal samples from South American ($n = 6$) and Subantarctic fur seals ($n = 4$) found dead along the south coast of Brazil were collected. Sequences were assigned to taxa using the Ribosomal Database Project-Bayesian classifier. Diversity of the microbiota was assessed by categorisation of sequence reads into operational taxonomic units (OTUs). Results indicate that Firmicutes (88.556 % - 84.016 %) was the predominant phylum in South American and Subantarctic fur seals. The distribution of Actinobacteria and Proteobacteria varied according to the fur seal species. Fusobacteria and Bacteroidetes represented less than 1% of the sequences. The most abundant order in both fur seals was Clostridiales (88.64 and 87.49%). Individual variable incidences were observed in the composition of family among the fur seals, though the families *Lachnospiraceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Ruminococcaceae* and *Coriobacteriaceae* were more prevalent. This study provides insight into the faecal bacterial community of wild young South American and Subantarctic fur seals.

INTRODUCTION

The microbiota is recognized as a major contributor to the digestion and utilization of foods in the gastrointestinal tract, which have numerous beneficial functions for the host, such as harvesting energy, regulating immunity and aiding cellular maturation (Flint *et al.* 2002a; Hand *et al.* 2013; Nelson *et al.* 2013).

Studies on the gut microbial ecosystems of humans and some domestic animals have been extensive and demonstrated that the phyla Firmicutes and Bacteroidetes were the most abundant, followed by Proteobacteria, Verrucomicrobia, Actinobacteria, and Fusobacteria (Hand *et al.* 2013; Sekirov *et al.* 2010). On the other hand, little research employing the evaluation of gut microbiota from wild animals has been undertaken, probably due to the migratory habits of some species and the difficulty in obtaining samples (Ley *et al.* 2008; Yildirim *et al.* 2010; Banks, Cary and Hogg 2014; Kong *et al.* 2014; Weldon *et al.* 2015). Even fewer studies have investigated wild marine mammals (Glad *et al.* 2010a; Glad *et al.* 2010b; Nelson *et al.* 2013; Smith *et al.* 2013).

The Brazilian coast, extending almost 7,500 km, is composed of many species of marine fauna from different bioregions. This diversity is mainly influenced by three different current systems: the North Brazil Current, the Brazil Current, and the Malvinas Current (Seeliger, Odebrecht and Castello 1997; Borzone, Pezzuto and Marone 1999; Muehe 2001). Along the Brazilian coast, there are four recorded species of Otariidae: South American sea lions (*Otaria flavescens*), South American fur seals (*Arctocephalus australis*) (Zimmerman 1783), Subantarctic fur seals (*Arctocephalus tropicalis*) (Gray 1872) and Antarctic fur seals (*Arctocephalus gazelle*) (Peters 1875). The most common fur seal species found on the southern Brazilian coast is the South American fur seal, but climatic phenomena are associated with the

increasing prevalence of Subantarctic fur seals (Moura, Dario and Siciliano 2011).

The South American fur seal has an insular distribution that extends along the coast of South America, from Isla Marco (Uruguay) to Isla Mayorca (Peru) (Campagna 2008). The main breeding colonies of this species are located on islands off the coast of Uruguay. Female South American fur seals wean their pups between 6 and 12 months, but sometimes they can wean up to three years (Phillips and Stirling 2000). The diet of South American fur seals includes myctophid and notothenid fishes, cephalopods and a small number of crustaceans (Croxall and Gentry 1987). Subantarctic fur seals are geographically widespread, and can be found in the Atlantic, Indian and Pacific Oceans. The largest breeding colonies are on Gough Island in the South Atlantic and Île Amsterdam in the southern part of the Indian Ocean. Female Subantarctic fur seals nurse pups until 11 months of age, shortly before giving birth to their next (Kirkman *et al.* 2002; Hofmeyr and Kovacs 2008). Their diet includes a variety of marine animals, like myctophid and notothenid fishes, cephalopods, crustaceans, and sometimes even rock hopper penguins (Hofmeyr and Kovacs 2008). The pelagic habitat of South American and Subantarctic fur seals has contributed to their dispersion, especially of young animals, outside of the reproductive period. Sometimes they visit coastal areas to rest and feed. The availability of food, predator-prey relationships, and climate all play an important role in the natural selection process of these animals (Oliveira *et al.* 2011).

The composition of the faecal microbiota in wild animals can provide numerous insights into the physiology of these animals. The analysis of the microbiota in wild animals can highlight important aspects concerning the ecological and evolutionary relationship between mammals and their gut microbiota, and in the future the data can be compared against environmental changes. Given these foundations, the goal

of this study is to characterise and compare the faecal bacterial community of young wild South American and Subantarctic fur seals found dead along the Southern Brazilian coast.

MATERIALS AND METHODS

Collection of seal samples

Faecal samples were collected from young wild South American ($n = 6$) and Subantarctic fur seals ($n = 4$). These animals were found dead along the North Coast of Rio Grande do Sul, Southern Brazil, from Itapeva beach, Torres ($29^{\circ}21'32.2''\text{S}$; $49^{\circ}44'10.3''\text{W}$) to Dunas Altas beach, Palmares do Sul ($30^{\circ}23'58.75''\text{S}$; $50^{\circ}17'24.73''\text{W}$), between July and August 2012. Carcasses were classified by their degree of decomposition into two categories as described by Geraci and Lounsbury (2005); where eight animals were classified as Code 2 and two as Code 3 (Table 1). All animals were considered young; their relative age was estimated according to body length, measured in a straight line from tip of nose to tip of tail, and the length of the basal condyle (Drehmer and Ferigolo 1997).

Necropsies were performed using conventional methods in the Centre for Coastal Studies, Limnology and Marine (Ceclimar) according to the protocol for sample collection described by Geraci and Lounsbury (2005) for pinnipeds. Six fur seals showed no sign of infection and the stomachs were empty, so the necropsies concluded that these animals had died of natural causes, and four presented with multiple fractures (Table 1). The faeces were collected directly from the large intestine using sterilized wooden sticks. The faecal samples (40 mL) were individually placed in sterile tubes, kept on ice, sent to the laboratory, and stored at -80°C . The sampling of young wild fur seals was performed according to the regulations

established by the *Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade* (SISBIO) nº 20185-4, code number 62966211.

Faecal DNA extraction

Total DNA was extracted from 0.1 g of faeces for each fur seal using the Power Faecal DNA Isolation Kit (MoBio, Carlsbad, CA, USA) in accordance with the manufacturer's standard protocol. The concentration and purity of each DNA extract were determined using a NanoDrop ND-1000 UV spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE).

PCR-amplification of bacterial 16S rRNA genes and sequencing

To characterize the microbiota present in each faecal sample, fragments of the 16S rRNA gene were amplified using the primers 515F and 806R, previously identified as suitable for Bacteria and Archaea (Bates *et al.* 2011). Amplification was performed in a 25 μ L mixture, consisting of 1 μ L of genomic DNA, 2 mM MgCl₂, 0.2 μ M of each primer, 200 μ M of each dNTP, 1U *Taq* DNA polymerase, and 1X reaction buffer. These primers amplify 291 bp from the V3-V4 hypervariable region of the prokaryotic 16S rRNA gene. Amplification was carried out in a Mastercycler Personal 5332 Thermocycler (Eppendorf®) according to the following program: initial denaturation at 94°C for 2 min, followed by 25 cycles of 45 sec at 94°C, 45 sec at 55°C, 1 min at 72°C and a final cycle at 72°C for 6 min. Three separate *PCR reactions* for each DNA sample were pooled, purified using the UltraClean PCR clean-up kit (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, USA), and then quantified using the PicoGreen dsDNA assay (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

The Institute of Petroleum and Natural Resources (IPR) sequenced the samples (Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil). After

purifying PCR amplicons using Agencount AMPure Beads (Beckman Coulter), library construction was performed as described in the Ion Plus Fragment Library from an initial amount of 100 ng of PCR product. Since all samples were sequenced in a multiplexed PGM run, barcode sequences were used to identify each sample from the total sequencing output. Sequencing was conducted on an Ion Personal Genome Machine (PGM) System (Thermo Fisher) using a chip Ion 316, following the manufacturer's instructions. Sequences have been submitted to the EMBL database under accession number PRJEB10279. Despite the short read lengths (~ 290 bp), this targeted gene region should also provide sufficient resolution for the accurate taxonomic classification of microbial sequences (Liu *et al.* 2007).

Bacterial community analyses

Initially, the sequences were filtered to remove sequences with fewer than 150 bp and trimmed for quality. DECIPHER's Find Chimeras web tool (Wright, Yilmaz and Noguera 2012) was used to identify and delete chimeras hidden in the 16S rRNA sequences. The taxonomic assignment of reads was done using the Ribosomal Database Project (RDP) at 97% confidence cut-off (Wang *et al.* 2007).

Operational taxonomic units (OTUs) were determined using the RDP Infernal Aligner and Complete Linkage Clustering tools (Cole *et al.* 2013). The coverage of the original communities by sequence reads was assessed in a rarefaction analysis. The number of observed OTUs was plotted versus the number of reads. Subsequently, the number of reads assigned to each OTU was normalized by the total number of reads obtained for each sample (Smith *et al.* 2013). The coverage of the original communities by sequence reads was assessed in a rarefaction analyses (Supplementary Figure 1).

Statistical analysis

Global community composition profiles were compared by principal coordinates analysis (PCoA). Statistical analysis was carried out using the Past3 program (Hammer, Happer and Ryan 2009). All other statistical comparisons of numerical means were carried out by ANOVA. Statistical significance was identified if p values < 0.05 .

Venn Diagram was used to show the core microbiota community in two species of fur seals. Diversity indices (Chao1 richness, Jaccard Diversity) were estimated using the Past 3 software.

RESULTS AND DISCUSSION

Data acquisition of 16S rRNA of South American and Subantarctic fur seals

A total of 74,155 16S rRNA gene sequences were obtained from the faecal samples of South American fur seals and 71,566 from Subantarctic fur seals. The average read length was 252 bp. Approximately 97% of the sequences were classified at the phylum level using an RDP classifier (Supplementary Table 1).

Composition of bacterial communities

The faecal bacterial community of young wild South American and Subantarctic fur seals was characterised into five phyla: Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria, and Bacteroidetes (Table 2). The Firmicutes phylum was the most abundant in faecal samples of South American and Subantarctic fur seals, representing 88.556 % and 84.016 % of all classified sequences, respectively ($p=0.2672$). This phylum has been deemed dominant in other wild marine mammals (Glad *et al.* 2010a; Glad *et al.* 2010b; Nelson *et al.* 2013; Smith *et al.* 2013; Banks,

Cary and Hogg 2014). Smith *et al.* (2013) reported that Firmicutes were predominant and represented 83.30 % of the sequences in the gut microbial composition of juvenile Australian fur seals. In gut communities of wild southern elephant seals and leopard seals from western Antarctica, this phylum was also dominant (Nelson *et al.* 2013). Glad *et al.* (2010a) observed a distribution of Firmicutes ranging from 22 % to 76% in the microbiota of wild hooded seals, harbour seals and grey seals. The phylum Firmicutes represented 99% of the sequences evaluated from faecal samples from wild polar bears (Glad *et al.* 2010b). The phylum Firmicutes has been associated with polysaccharide degradation. Moreover, studies of human subjects posit that butyrate-producing species and species that convert lactate to butyrate or propionate have key roles in the anaerobic metabolism in the intestinal tract (Flint *et al.* 2012a; Flint *et al.* 2012b).

Significantly fewer bacteria from the phylum Actinobacteria were observed in the faecal samples of South American fur seals (2.568 % of all sequences collected) when compared to Subantarctic fur seals (10.924 %) ($p = 0.0007$). Banks, Cary and Hogg (2014) showed that in the faecal samples of wild Weddell seals, Actinobacteria represented 19.50 % of the sequences. On the other hand, a low frequency of this phylum was also observed in Australian sea lions (2.00 %) (Lavery *et al.* 2012). Diet may play an important role in the difference in the amount of Actinobacteria found in the Subantarctic and South American fur seal microbiota. A greater variety of cephalopods in the stomachs of young Subantarctic fur seals was apparent when compared with South American fur seals (Santos and Haimovici 2001). *Bifidobacteria* is the main genera of this phylum, and its presence is correlated with the degradation of long-chain polyunsaturated fatty acids found in fur seal milk (Arnould and Hindell 1999; Smith *et al.* 2013).

The phylum Proteobacteria was observed in high frequency in the faecal community of South American fur seals with a relative abundance of 6.289 % compared with 0.404 % in Subantarctic fur seals. Differences in the frequency of Proteobacteria have been observed in faecal samples of other wild marine mammal species (Glad *et al.* 2010a; Glad *et al.* 2010b; Lavery *et al.* 2012; Nelson *et al.* 2013; Smith *et al.* 2013, Banks, Cary and Hogg 2014). The frequency of this phylum in the wild marine mammal has been shown to vary according to the host phylogeny, diet, and age (Nelson *et al.* 2013). An important member of this phylum is *Edwardsiella tarda*. This is the most frequently isolated from the fur seal *Otaria flavences* found on the coast of Chile and is already recognized as a constituent of the microbiota of marine animals (González-Fuentes *et al.* 2010).

A low frequency of bacteria from the phyla Fusobacteria and Bacteroidetes was observed in the faecal bacterial community of South American and Subantarctic fur seals, representing less than 2 % of the classified sequences. These phyla are rare in other marine mammals such as dugongs, manatees, and Australian sea lions (Tsukinowa *et al.* 2008; Merson *et al.* 2014). The low number of sequences of Fusobacteria has already been observed in Australian fur seals, representing less than 1% of the sequences (Smith *et al.* 2013). Nelson *et al.* (2015) showed that the presence of phylum Bacteroidetes ranges from 2% to 10% in Pinnipedes and from 8.00 % to 21.00 % in Phocidae members. Bacteroidetes are known to possess many genes that encode carbohydrate-active enzymes and that can switch readily between different energy sources in the gut, depending on nutrient availability (Flint *et al.* 2012a; Flint *et al.* 2012b).

The phyla distribution in the faecal microbiota of South American fur seals and Subantarctic fur seals was comparable, and changes in the composition were

detected in both animals (Table 2). The diet influences the gut microbiota of hosts by direct introduction of microbes associated with their prey and also via the nutritional composition of diet (Nelson *et al.* 2013). Other factors such as age, habitat, and sex might affect the composition of the gut microbiota (Kostic, Howitt and Garret 2013).

The 16S rRNA gene sequences were further analysed to order, class and family. The Clostridiales was the most abundant order in all fur seals analysed (Table 3). This order represented more than 99 % of the sequences classified as Firmicutes. Consequently, it is also the most frequent in global classification, representing 88.648% in South American fur seals and 87.493 % in Subantarctic fur seals of all sequences evaluated. The dominance of individuals from the class Clostridia was also observed in wild Australian fur seals aged 2-9 months (Smith *et al.* 2013). The high levels of metabolite products, and the colonization in close proximity to the intestinal mucosa, showed that commensal Clostridia can exert a strong influence on the host immune system (Bibbò *et al.* 2014). The genus *Clostridium* is the main member of this class, and it is recognized as a common microorganism in the marine environment and is associated with the viscera of finfish, crabs and shellfish (Ivanov *et al.* 2008).

Differences were observed in the composition of family among all fur seals examined, though the families *Lachnospiraceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Ruminococcaceae* and *Coriobacteriaceae* were the most abundant, with variable incidence between the individuals (Table 4). These results demonstrate that there are variations in the faecal microbial composition of different fur seals. These families were also observed in wild Australian fur seals, with significant differences correlated to animal age (Smith *et al.* 2013). The Ruminococcaceae family was also observed in manatees, and the genus *Ruminococcus* was largely observed in dugongs,

suggesting an important role of this family in marine mammals. Members of families Lachnospiraceae and Ruminococcaceae are important butyrate producers, and play an important role in host immune functions (Bibbò *et al.* 2014).

Diversity based on operational taxonomic units

Determination of diversity based on the identification of reads that match known sequences on the RDP database has limitations (Hand *et al.* 2013). Based on this fact, we swapped the diversity allocation of reads for “operation taxonomic units” (OTUs). To determine whether sampling depth was sufficient to accurately characterize the bacterial community under study, we constructed a rarefaction curve using the cluster file generated with Aligner and Cluster Linkage tools from the RDP pipeline.

Microbial richness was defined based on the number of OTUs (OTUs at 97% similarity) calculated using the Chao1 estimator. The richness is similar between all fur seals, except for one faecal sample from a South American fur seal (A.A 1), which presented a more diverse microbiota (Figure 1). Besides the fact that all animals were juveniles, individual variation can be associated with the feeding behaviour of these animals. The origin of these animals can also impinge on inter-individual variation. Ferreira *et al.* (2008) compared the mitochondrial DNA of Subantarctic fur seals found on the Brazilian coast and proposed a subdivision of these animals. They refuted the hypothesis that only Subantarctic fur seals from Gough Island could migrate to our coast, demonstrating that Subantarctic fur seals from two other regions of the world also migrate to Brazilian coastal waters.

To explore similarities in the OTU data set, a principal coordinates analysis (PCoA) of all fur seals was performed, revealing little dissimilarity between the fur seal based on OTUs (Figure 2). This fact highlights that the common characteristics of species, such as physiology, behaviour, similarity in diet and social interaction can influence the microbiota. One exception was observed for the South American fur seal A.A.5 sample. Following RDP classification, this fur seal already exhibited a lower proportion of Firmicutes and a significant Proteobacteria community.

A total of 61 OTUs were identified in faecal samples of wild South American and Subantarctic fur seals. This result is consistent with previous studies that analyzed faecal bacterial diversity of wild marine animals. In faecal contents of Arctic and Sub-Arctic seals, between 12 and 28 OTUs were identified by Glad *et al.* 2010a. In addition, up to 70 OTUs were detected in faecal material of Australian fur seal, closely related species of South American and Subantarctic fur seals (Smith *et al.* 2013). In spite of the interspecies variations, South American and Subantarctic fur seals shared a great number of OTUs (40 OTUs), resulting in an overlap of 66.667% of all OTUs (Figure 3). Among the phyla community, the Firmicutes (43 OTUs), Actinobacteria (8 OTU), Proteobacteria (8 OTUs) and Bacteroidetes (2 OTUs) were shared by both groups of animals. Twenty OTUs were unique to South American fur seals, while one OTU was unique to Subantarctic fur seals (Supplementary Table 2). Results from the Venn diagram could be used to understand the relative components across the microbial assemblages in two species of fur seals.

CONCLUSIONS

Our data support the predominance of the phylum Firmicutes in the faecal samples of young wild Subantarctic and South American fur seals, thus concurring with the mainstream literature on marine mammals. In comparison with the composition of the faecal bacterial community of other mammals, this phylum is predominant, followed by Actinobacteria and Proteobacteria, which contribute to a minor extent, and Bacteroidetes, which exhibits an even lower prevalence. Although there are general trends regarding the microbiota of determinate species, individual variation can be associated with factors such as diet, age, habitat, sex and others. High-throughput sequencing technology was used to examine the faecal microbiota of Subantarctic and South American fur seals, providing important insights into the physiology of these animals and making possible comparison of these data with future studies.

Funding

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil (CNPq - #444335/2014-5, #300912/2012-9, #302421/2012-2 and #303251/2014-0) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) of the Brazilian government

Acknowledgements

We are grateful to Grupo de Estudos de Mamíferos Aquáticos do Rio Grande do Sul and all staff from Center for Coastal Studies, Limnology and Marine (Ceclimar) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul for their help in the data collection.

References

- Arnould JP, Hindell MA. The composition of Australian fur seal (*Arctocephalus pusillus doriferus*) milk throughout lactation. *Physiol Biochem Zool* 1999; **72**: 605-12.
- Banks JC, Cary SC, Hogg ID. Isolated faecal bacterial communities found for Weddell seals, *Leptonychotes weddellii*, at White Island, McMurdo Sound, Antarctica. *Polar Biol* 2014; **37**: 1857-64.
- Bates ST, Berg-Lyons D, Caporaso JG *et al.* Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *The ISME journal* 2011; **5**: 908-17.
- Bibbò S, Lopetuso LR, Ianiro G, *et al.* Role of microbiota and innate immunity in recurrent *Clostridium difficile* infection. *J Immunol Res* 2014, DOI: org/10.1155/2014/462740
- Borzone CA, Pezzuto PR, Marone E. Oceanographic characteristics of a multi-specific fishing ground of the central South Brazil bight. *Mar Ecol* 1999; **20**: 131-46.
- Campagna, C. (IUCN SSC Pinniped Specialist Group). 2008. *Arctocephalus australis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008:e.T2055A9211535. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T2055A9211535.en> . Downloaded on 12 November 2015.
- Cole JR, Wang QF, Fish JA *et al.* Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 2014, DOI:10.1093/nar/gkt1244.
- Croxall J, Gentry R. Status, Biology and Ecology of Fur Seals, Proceedings of an International Symposium and Workshop Cambridge (NOAA Technical Report NMFS; England), 1987.
- Drehmer CJF, Ferigolo J. Comparative cranial osteology of *Arctocephalus Australis* and *A. Tropicalis* (Pinnipedia, Otariidae). *Iheringia Ser Zool* 1997; **83**: 137-149.
- Ferreira JM, De Oliveira LR, Wynen L *et al.* Multiple origins of vagrant Subantarctic fur seals: a long journey to the Brazilian coast detected by molecular markers. *Polar Biol* 2008; **31**: 303-308.
- Flint HJ, Scott KP, Louis P *et al.* The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012a; **9**: 577-589.
- Flint HJ, Scott KP, Duncan SH *et al.* Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut microbes* 2012b; **3**: 289-306.
- Geraci J, Lounsbury V. *Marine mammals ashore: a field guide for strandings National Aquarium in Baltimore*. Baltimore, MD 2005.
- Glad T, Kristiansen VF, Nielsen KM *et al.* Ecological characterisation of the colonic microbiota in Arctic and Sub-Arctic seals. *Microb Ecol* 2010a; **60**: 320-330.
- Glad T, Bernhardsen P, Nielsen K, *et al.* Bacterial diversity in faeces from polar bear (*Ursus maritimus*) in Arctic Svalbard. *BMC Microb* 2010b; **10**: 10.
- González-Fuentes M, Latif F, Fernández F *et al.* Especies de la familia Enterobacteriaceae en heces de lobo marino común, *Otaria flavescens* establecido en el río Valdivia. *Rev Biol Mar Ocean* 2010; **45**: 331-334.
- Hammer Ø, Harper D, Ryan P. *PAST-PAleontological SStatistics, ver. 1.89*. University of Oslo, Oslo 2009.

- Hand D, Wallis C, Colyer A *et al.* Pyrosequencing the canine faecal microbiota: breadth and depth of biodiversity. *PloS One* 2013, DOI:10.1371/journal.pone.0053115.
- Hofmeyr G, Kovacs K. 'Arctocephalus tropicalis. The IUCN Red List of Threatened Species.', <<http://www.iucnredlist.org/>>, accessed Downloaded on 02 September 2015.
- Ivanov II, Frutos RL, Manel N *et al.* Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microb* 2008; **4**: 337-349.
- Kirkman S, Bester M, Hofmeyr G *et al.* Pup growth and maternal attendance patterns in Subantarctic fur seals. *Afr Zool* 2002; **37**: 13-19.
- Kong F, Zhao J, Han S *et al.* Characterization of the gut microbiota in the red panda (*Ailurus fulgens*). *PloS One* 2014, DOI: 10.1371/journal.pone.0087885.
- Kostic AD, Howitt MR, Garrett WS. Exploring host–microbiota interactions in animal models and humans. *Genes Dev* 2013; **27**: 701-718.
- Lavery TJ, Roudnew B, Seymour J *et al.* High nutrient transport and cycling potential revealed in the microbial metagenome of Australian sea lion (*Neophoca cinerea*) faeces. *PLoS One* 2012, DOI: 10.1371/journal.pone.0036478.
- Ley RE, Hamady M, Lozupone C *et al.* Evolution of Mammals and Their Gut Microbes. *Science* 2008; **320**: 1647-1651.
- Liu Z, Lozupone C, Hamady M *et al.* Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Res* 2007; DOI:10.1093/nar/gkm541.
- Merson SD, Ouwerek D, Gulino LM *et al.* Variation in the hindgut microbial communities of the Florida manatee, *Trichechus manatus latirostris* over winter in Crystal River, Florida. *FEMS Microbiol Ecol* 2014; **87**: 601-615.
- Moura JF, Di Dario BP, Siciliano S. Occurrence of pinnipeds on the coast of Rio de Janeiro State, Brazil. *Mar Biodivers Rec* 2011, DOI:10.1017/S1755267211000030.
- Muehe D. Critérios morfodinâmicos para o estabelecimento de limites da orla costeira para fins de gerenciamento. *Rev Bras Geomorfol* 2001; **2**: 35-44.
- Nelson TM, Rogers TL, Carlini AR *et al.* Diet and phylogeny shape the gut microbiota of Antarctic seals: a comparison of wild and captive animals. *Environ Microbiol* 2013; **15**: 1132-45.
- Nelson TM, Apprill A, Mann J *et al.* The marine mammal microbiome: current knowledge and future directions. *Microbiol Australia* 2015; **36**: 8-13.
- Oliveira A, Kolesnikovas CKM, Serafini PP *et al.* Occurrence of Pinnipeds in Santa Catarina between 2000 and 2010. *Lat Am J Aquat Mamm* 2011; **9**: 145-49.
- Phillips AV, Stirling I. Vocal Individuality In Mother And Pup South American Fur Seals, *Arctocephalus Australis*. *Mar Man Sci* 2000; **16**: 592-616.
- Santos RA, Haimovici M. Cephalopods in the diet of marine mammals stranded or incidentally caught along southeastern and southern Brazil (21–34 S). *Fish Res* 2001; **52**: 99-112.
- Seeliger, U, Odebrecht, C, Castello, JP. *Subtropical convergence environments: the coast and sea in the southwestern Atlantic*. Berlin/Heidelberg/New York, 1997.
- Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM *et al.* *Gut Microbiota in Health and Disease*. *Physiol Rev* 2010; **90**: 859-904.

- Smith SC, Chalker A, Dewar ML *et al.* Age-related differences revealed in Australian fur seal *Arctocephalus pusillus doriferus* gut microbiota. *FEMS Microbiol Ecol* 2013; **86**:246-255.
- Tsukinowa E, Karita S, Asano S *et al.* Fecal microbiota of a dugong (*Dugong dugong*) in captivity at Toba Aquarium. *J Gen App Microbiol* 2008; **54**: 25-38.
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM *et al.* Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 2007; **73**: 5261-67.
- Weldon L, Abolins S, Lenzi L *et al.* The Gut Microbiota of Wild Mice. *PloS One* 2015, DOI: 10.1371/journal.pone.0134643.
- Wright ES, Yilmaz LS, Noguera DR. DECIPHER, a search-based approach to chimera identification for 16S rRNA sequences. *Appl Environ Microbiol* 2012; **78**: 717-725.
- Yildirim S, Yeoman CJ, Sipos M *et al.* Characterization of the fecal microbiome from non-human wild primates reveals species specific microbial communities. *PloS One* 2010, DOI: 10.1371/journal.pone.0013963.

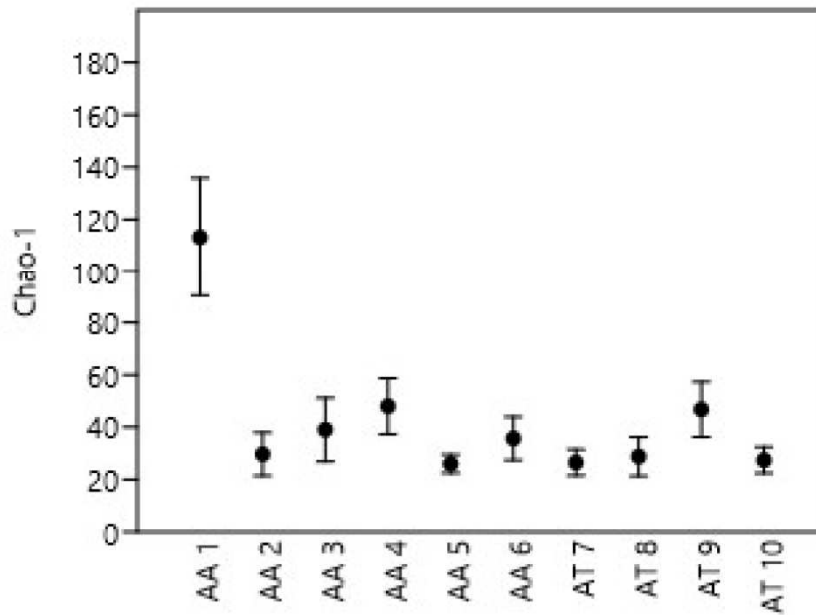


Figure 1. Richness of the fecal bacterial community of South American (AA) and Subantarctic fur seals (AT). Richness of the fecal bacterial community was measured using Chao 1 mean. Error bars represent standard error (SE).

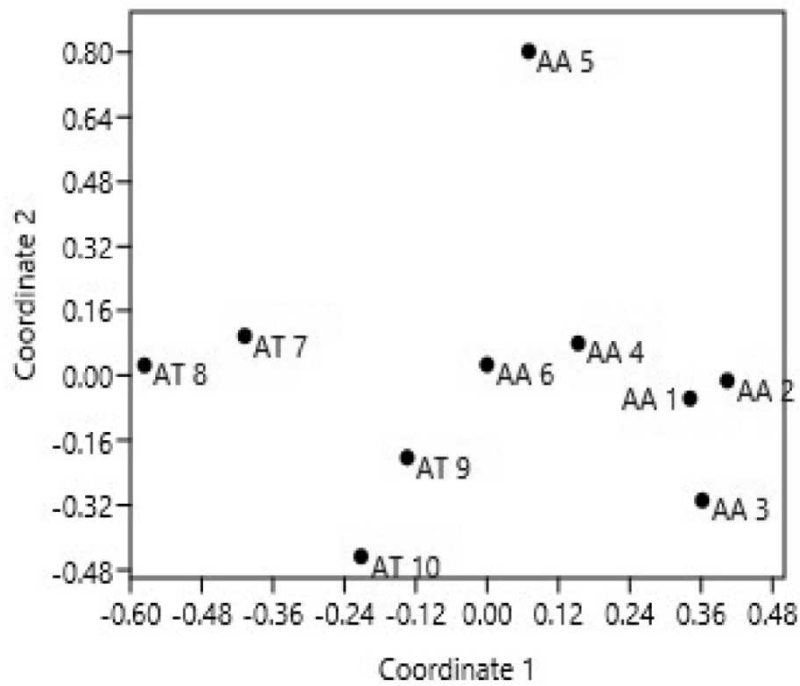


Figure 2. PCoA of faecal samples of wild young South American (AA) and Subantarctic fur seals (AT). Analysis revealed little dissimilarity between fur seal groups based on OTUs, except for sample A.A 5.

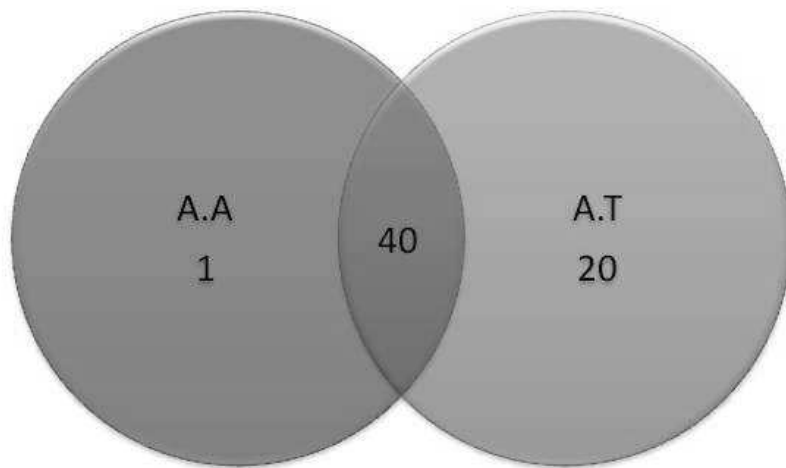


Figure 3. Venn diagrams illustrating overlap of OTUs communities among wild young South American (A.A) and Subantarctic fur seals (A.T).

Table 1. Details of young wild South America (*A.australis*) and Subantartic (*A.tropicalis*) fur seals analyzed in this study.

	Samples	Sex	Geraci Code¹	Length (cm)	Weight (kg)	SCA²	<i>Causa mortis</i>
South America fur seals (<i>A. australis</i>)							
G1508	A.A 1	M	2	108	16	Empty	Natural dead
G1516	A.A 2	F	2	83	8.9	Empty	Cervical fracture
G1521	A.A 3	M	2	92	9.5	Empty	Natural dead
G1525	A.A 4	M	2	116.5	14.7	Empty	Natural dead
G1534	A.A 5	M	3	101.4	15.2	Empty	Natural dead
G1527	A.A 6	F	2	88	11.2	Empty	Natural dead
Subantartic fur seals (<i>A. tropicalis</i>)							
G1535	A.T 7	M	2	91.9	8.4	Empty	Multiple fracture
G1537	A.T 8	M	2	90.6	9	Empty	Natural dead
G1561	A.T 9	M	2	91.9	8.8	Empty	Multiple fracture
G1577	A.T 10	M	3	80.5	7.1	Full	Multiple fracture

1: Geraci code based on Geraci and Lounsbury (2005); 2: SCA: Stomach content analysis; m: male, f: female

Table 2. Classification of the phylum level in each faecal sample of young wild Subantartic and South America fur seals, represented as percentages of sequences analysed.

Phylum	South America fur seals (<i>A. australis</i>)							Subantartic fur seals (<i>A. tropicalis</i>)				
	A.A 1	A.A 2	A.A 3	A.A 4	A.A 5	A.A 6	Total \pm SD	A.T 7	A.T 8	A.T 9	A.T 10	Total \pm SD
Firmicutes	87.540	90.408	94.736	84.337	79.451	94.867	88.556\pm0,060	82.486	90.378	86.111	77.086	84.016 \pm 0,056
Actinobacteria	5.737	4.796	1.451	1.276	0.006	2.144	2.568\pm0,022	8.053	9.301	12.419	13.925	10.924 \pm 0,027
Proteobacteria	5.850	3.140	1.199	8.158	17.692	1.337	6.289\pm0,062	0.902	0.066	0.579	0.069	0.404 \pm 0,004
Bacteroidetes	0.210	0.000	0.144	0.653	0.000	0.047	0.175\pm0,002	0.006	0.041	0.018	0.586	0.162 \pm 0,002
Fusobacteria	0.549	1.088	2.209	2.640	0.056	0.720	1.210\pm0,010	0.000	0.000	0.009	0.005	0.004 \pm 0,000
Unclassified	0.113	0.569	0.260	2.937	2.796	0.885	1.260\pm0,012	8.553	0.214	0.864	8.328	4.489 \pm 0,045

Table 3. Classification of the order level in each faecal sample of young wild Subantarctic and South America fur seals, represented as percentages of sequences analyzed.

Order	South America fur seals (<i>A. australis</i>)							Subantarctic fur seals (<i>A. tropicalis</i>)				
	A.A 1	A.A 2	A.A 3	A.A 4	A.A 5	A.A 6	Total \pm SD	A.T 7	A.T 8	A.T 9	A.T 10	Total \pm SD
Clostridiales	87.413	90.629	94.860	81.953	81.418	95.620	88.648\pm0.062	89.702	90.103	86.723	83.446	87.493\pm0.031
Lactobacillales	0.227	0.000	0.000	4.554	0.040	0.008	0.805\pm0.018	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000\pm0.000
Coriobacteriales	5.711	4.773	1.433	1.268	0.000	2.095	2.547\pm0.022	8.800	9.321	12.508	15.176	11.451\pm0.030
Campylobacterales	2.039	2.436	0.927	1.146	0.403	0.290	1.207\pm0.009	0.878	0.016	0.117	0.006	0.254\pm0.004
Enterobacteriales	2.297	0.075	0.000	6.479	17.666	0.611	4.522\pm0.069	0.096	0.033	0.409	0.000	0.135\pm0.002
Fusobacteriales	0.550	1.094	2.215	2.720	0.058	0.726	1.227\pm0.010	0.000	0.000	0.009	0.006	0.004\pm0.000
Bacteroidales	0.210	0.000	0.138	0.672	0.000	0.048	0.178\pm0.003	0.006	0.041	0.018	0.640	0.176\pm0.003
Vibrionales	1.100	0.000	0.000	0.000	0.012	0.016	0.188\pm0.004	0.000	0.000	0.004	0.000	0.001\pm0.000
Others	0.210	0.820	0.311	0.840	0.121	0.508	0.468\pm0.003	0.018	0.016	0.094	0.093	0.055\pm0.000
Unclassified	0.243	0.174	0.116	0.367	0.282	0.079	0.210\pm0.001	0.499	0.469	0.117	0.634	0.430\pm0.002

Table 4. Classification of the family level in each faecal sample of young wild Subantarctic and South America fur seals, represented as percentages of sequences analysed.

Families	South America fur seals (<i>A. australis</i>)							Subantarctic fur seals (<i>A. tropicalis</i>)				
	A.A 1	A.A 2	A.A 3	A.A 4	A.A 5	A.A 6	Total \pm SD	A.T 7	A.T 8	A.T 9	A.T 10	Total \pm SD
Lachnospiraceae	63.396	21.389	10.386	40.138	58.444	67.283	43.506 \pm0.235	71.678	77.765	57.931	20.469	56.960\pm0.257
Peptostreptococcaceae	21.456	40.339	14.799	26.135	0.000	21.869	20.766 \pm0.132	10.857	3.472	15.619	28.217	14.541\pm0.103
Ruminococcaceae	1.557	19.124	67.227	7.408	9.635	4.828	18.296 \pm0.246	3.319	1.711	1.908	33.208	10.036\pm0.154
Coriobacteriaceae	5.725	4.781	1.435	1.273	0.000	2.096	2.551 \pm0.022	8.844	9.365	12.523	15.273	11.501\pm0.029
Others	7.000	4.358	3.580	17.000	19.000	3.000	8.989 \pm0.071	0.901	0.116	0.270	0.761	0.512\pm0.003
Unclassified	1.038	9.935	2.573	8.666	13.550	1.695	6.242 \pm0.051	4.304	7.538	11.340	2.089	6.317\pm0.040

Supplementar Material

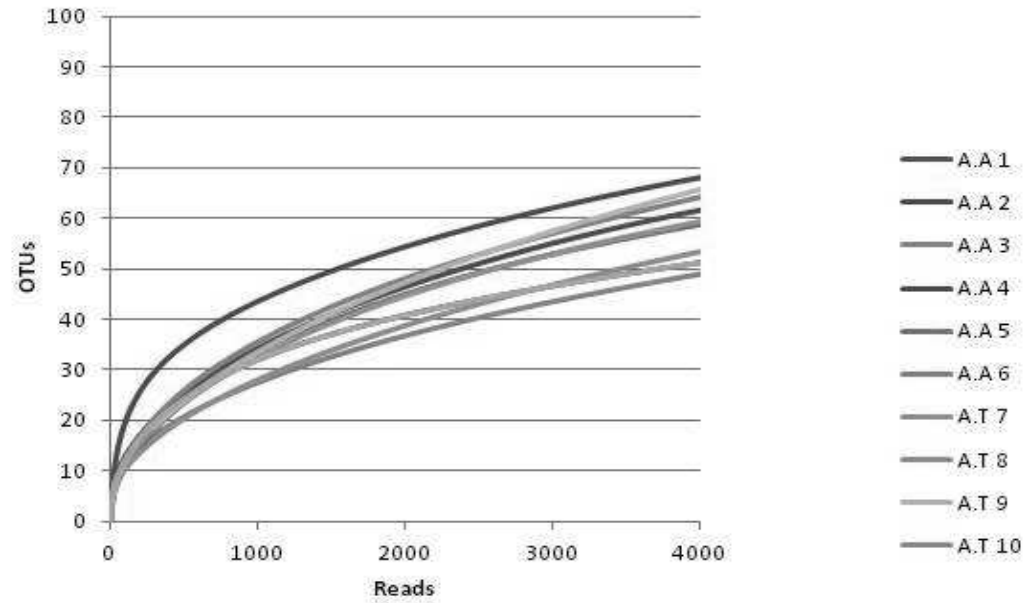


Figure S1. Rarefaction curves based on pyrosequencing of bacterial communities on faecal samples of wild young South American (A.A) and Subantarctic fur seals (A.T). Operational Taxonomical Units (OTUs) were defined at 97% sequence similarity.

Tables Supplement

Table S1. Number of reads per sample pre quality filtering and pos quality filter and quimera remove

	Samples	Pre-Filtering	Pos-Filtering
<i>South America fur seals</i> <i>(A. australis)</i>	A.A 1	146728	6188
	A.A 2	219601	4046
	A.A 3	221729	13851
	A.A 4	120703	6742
	A.A 5	279349	17889
	A.A 6	276034	25439
Average		210690	12359
<i>Subantartic fur seals</i> <i>(A. tropicalis)</i>	A.T 7	157009	18180
	A.T 8	204113	12181
	A.T 9	253505	22445
	A.T 10	286537	18760
Average		225291	17891

Table S2. Shared and unique OTU in faecal bacterial community of South American and Sub Antarctic Fur Seals.

OTU ID	Phylum	Class	Order	Family
Shared OTU				
OTU 2	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae
OTU 4	Actinobacteria	Actinobacteria	Coriobacteriales	Coriobacteriaceae
OTU 8	Proteobacteria	Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	Helicobacteraceae
OTU 11	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae
OTU 21	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae
OTU 24	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae
OTU 1	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae
OTU 29	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidaceae
OTU 40	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae
OTU 41	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae
OTU 43	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae
OTU 61	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae
OTU 67	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae
OTU 82	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae 1

OTU 115	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae
OTU 126	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae
OTU 175	Proteobacteria	Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	Campylobacteraceae
OTU 188	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae
OTU 214	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae
OTU 384	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae
OTU 504	Actinobacteria	Actinobacteria	Coriobacteriales	Coriobacteriaceae
OTU 572	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidaceae
OTU 639	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae
OTU 779	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae
OTU 168	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae
OTU 813	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae
OTU 827	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae
OTU 473	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae
OTU 504	Actinobacteria	Actinobacteria	Coriobacteriales	Coriobacteriaceae
OTU 524	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae
OTU 32	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae

OTU 382	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae
OTU 567	Actinobacteria	Actinobacteria	Coriobacteriales	Coriobacteriaceae
OTU 682	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae
OTU 492	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae
OTU 873	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae
OTU 633	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae
OTU 940	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae
OTU 121	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae
OTU 207	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae
Unique OTU South American Fur Seal (<i>A. australis</i>)				
OTU 68	Fusobacteria	Fusobacteriia	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae
OTU 686	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Sutterellaceae
OTU 476	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae
OTU 3	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae
OTU 7	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae
OTU 63	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae

OTU 104	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Vibrionales	Vibrionaceae
OTU 300	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae
OTU 337	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae
OTU 372	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae 1
OTU 430	Proteobacteria	Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	Helicobacteraceae
OTU 444	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae
OTU 646	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae
OTU 741	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae
OTU 869	Actinobacteria	Actinobacteria	Rubrobacterales	Rubrobacteraceae
OTU 911	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Actinomycetaceae
OTU 772	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae
OTU 509	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae
OTU 362	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae
OTU 678	Actinobacteria	Actinobacteria	Coriobacteriales	Coriobacteriaceae
Unique OTU Sub Antarctic Fur Seal (<i>A. tropicalis</i>)				
OTU 930	Actinobacteria	Actinobacteria	Coriobacteriales	Coriobacteriaceae

4.2. Artigo 2

Título: *Enterococcus* species diversity in fecal samples of wild marine species by real-time PCR

Aceito Canadian Journal of Microbiology em Setembro de 2016.

***Enterococcus* species diversity in fecal samples of wild marine
species by real-time PCR**

Aline Weber Medeiros¹, Derek Blaese Amorim², Maurício Tavares², Tiane Martin de Moura³, Ana Claudia Franco¹, Pedro Alves d’Azevedo⁴, Jeverson Frazzon⁵, Ana Paula Guedes Frazzon^{1*}

¹. Microbiology, Immunology and Parasitology Department, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS). Sarmiento Leite, 500, room 216, ZIP Code. 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: alinewm@gmail.com; ana.franco@ufrgs.br; ana.frazzon@ufrgs.br

². Center for Coastal Studies, Limnology and Marine (CECLIMAR), Institute of Biosciences. UFRGS. Av. Tramandaí, 976, ZIP Code. 95625-000, Imbé, RS, Brazil. E-mail: derek@ufrgs.br; mauricio.tavares@ufrgs.br

³. Department of Nutrition, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil. Rua Gomes Carneiro, 1 – Centro, ZIP 96010-610, Pelotas, RS, Brazil. E-mail: tianedemoura@gmail.com

⁴. Gram-positive Coccus Laboratory, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA). Sarmiento Leite, 245, room 204, ZIP Code. 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: pedroaze@ufcspa.edu.br

⁵. Food Science Institute, UFRGS. Av. Bento Gonçalves 9500 – Campus do Vale – Prédio 443.212, ZIP. 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: jeverson.frazzon@ufrgs.br

* Corresponding author: Ana Paula Guedes Frazzon. Microbiology, Immunology and Parasitology Department. Federal University of Rio Grande do Sul.

Av. Sarmiento Leite 500, room 216. Zip code. 90050-170. Porto Alegre, RS, Brazil.

Telephone: 55 51 3308 4505; Fax 55 51 3308 4505; E-mail: ana.frazzon@ufrgs.br.

Abstract

Analyses using culture-independent molecular techniques have improved our understanding of microbial composition. The aim of this work was to identify and quantify enterococci in fecal samples of wild marine species using real-time quantitative PCR (qPCR). Seven *Enterococcus* species were examined in fecal DNA of South American fur seals (*Arctocephalus australis*), Subantarctic fur seals (*Arctocephalus tropicalis*), green turtles (*Chelonia mydas*), Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*), snowy-crowned Tern (*Sterna trudeaui*), white-backed Stilt (*Himantopus melanurus*), white-chinned Petrels (*Procellaria aequinoctialis*), red knot (*Calidris canutus*), black-browed albatross (*Thalassarche melanophris*). All *Enterococcus* species evaluated were detected in all fecal samples of wild marine species, with a concentration ranged between 10^6 to 10^{12} copies/ng of total DNA. Differences in the enterococci distribution were observed. *Enterococcus faecalis* and *E. mundtii* were most abundant in marine mammals. *Enterococcus faecalis* was frequent in green turtles, Magellanic penguins, snowy-crowned Tern, red knot, black-browed and albatross. *Enterococcus hirae* and *E. gallinarum* showed elevated occurrence in white-backed Stilt, and *E. faecium* in white-chinned Petrel. This study showed highest diversity of enterococci in feces of wild marine species than currently available data, and ensure that culture-independent analysis help us to enhance our understanding about enterococci in gastrointestinal tracts of wild marine species.

Key-words: enterococci; fecal DNA; wild marine species; real-time PCR.

Introduction

Enterococcus are commensal bacteria of the gastrointestinal (GI) tract of different animals, and have been emerged as an important cause of nosocomial infections (Devriese et al. 2006). They are also commonly found in soil, water and food (Gilmore et al. 2014). They are bacteria highly adapted to different environments, able to grow in high salt concentrations (6.5% NaCl), extreme temperatures (10°C to 45°C) and pH (4.8 to 9.6), and in presence of bile salts (40 %) (Fischer and Phillips 2009).

Among the 50 species of *Enterococcus* were described. *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* are the most abundant in GI tracts of mammals and other animals. Other species, including *E. hirae*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, and *E. mundtii* have also been isolated from GI tract of animals and coastal water (Fergusson et al. 2005; Layton et al. 2010). The species distribution, as well as, the differences in the proportions in each niche, can vary according to individual characteristics (e.g. age, gender), habitat (e.g. seasonal variations, diet) and geographical location (Lebreton et al. 2014).

The Southwestern Atlantic Ocean is influenced by three current systems and characterized by distinctive bathymetry, hydrography, productivity

patterns and biological communities (Bisbal 1995). This region presents ecosystems with high environmental relevance for marine species, which use this area for feeding and resting. In Southern Brazil coast, many marine species are found resting or dead (Seeliger et al. 1997). Until today, few studies have examined the presence of enterococci in wild marine species, probably due to the migratory habits of many species and the difficulty in obtaining samples. Enterococci were first reported in wild harbor seals, and Northern elephant seals (Thornton et al. 1998). After that, other studies cultured enterococci from California sea lion, harbor seal, Northern elephant seal, Gilthead seabream, birds and echinoderm species (Johnson et al. 1998; Dailey et al. 2002; Poeta et al. 2005; Barros et al. 2011; Marinho et al. 2013; Ryu et al. 2014). Recently, enterococci were isolated from fecal samples of wild marine species, such as seabirds, sea turtles and South American fur seals and Subantarctic fur seals (Santestevan et al. 2015; Prichula et al. 2016).

The culture-based method is the most common method for enumerating and to identification of enterococci (Fergusson et al. 2005; Poeta et al. 2005; Layton et al. 2010; Ryu et al. 2014; Santestevan et al. 2015; Prichula et al. 2016). Though, this method is unreliable for the detection of injured cells. Cultivation-independent methods have improved the identification and quantification of microorganisms, and real-time quantitative PCR (qPCR) has become suitable alternative (Heid et al. 1996; He and Jiang 2005). Therefore, the purpose of this study was to identify and quantify enterococcal species in fecal DNA of wild marine species, including green turtles, South American fur seals, Subantarctic fur seals, Magellanic penguins, snowy-crowned Tern, white-backed Stilt, white-chinned Petrel, red knot, black-browed albatross using qPCR.

Material and Methods

Collection of animals samples

Twenty-four wild marine species (eight seabirds, two shorebirds, three sea turtles, and eleven marine mammals) were found alive or dead along the North Coast of Rio Grande do Sul, southern Brazil, from Itapeva beach, Torres (29°21'32.2"S; 49°44'10.3"W) to Dunas Altas beach, Palmares do Sul (30°23'58.75"S; 50°17'24.73"W), between July 2012 and May 2014 (Table 1). Animals were classified into Code 1 (live animals), Code 2 (carcasses are those in fresh) and Code 3 (moderate decomposed, but organs basically intact) as described by Geraci and Lounsbury (2005) (Table 1).

Cloacal/rectal swabs were collected and transferred to a vial containing Stuart's medium and kept under refrigeration until processing. Feces were collected directly from the large intestinal using sterilized wooden sticks, placed in sterile tubes, kept on ice, sent to the laboratory, and stored at -80 °C.

Necropsies were performed using conventional methods in the Center for Coastal Studies, Limnology and Marine (Ceclimar) according to protocol for sample collection described in Geraci and Lounsbury (2005) for pinnipeds. Since fur seals showed no sign of infection and the stomachs were empty, the necropsies concluded that these animals had died of natural causes.

The sampling of wild marine species was performed according to the regulations established by the *Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade* (SISBIO) nº 20185-4, code number 62966211.

Total DNA extraction

Isolation of DNA from swabs followed the Fredricks and Relman protocol (1998) with some modification. The swabs were suspended in two mL of saline 0.85% and maintained under agitation (100 rpm) at 37 °C for 24 h and 1.5 mL was

used to DNA extraction. From fecal samples, 0.1 g of feces for each fur seal were used to extract total DNA using Power Fecal DNA Isolation Kit (MoBio, Carlsbad, CA, USA) in accordance to the manufacturer's standard protocol. The concentration and purity of each total DNA extract were determined using a NanoDrop ND-1000 UV spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE).

In order to assess the number of copies for each species, we decided to standardize the amount of initial DNA in qPCR due to variety in the specimens (swabs and stool) and the respectively DNA extraction method used. Thus, the results presented here refer to the number of copies detected by 1 ng DNA of each sample.

Enterococci quantification by real-time PCR

The method was performed in two rounds according to the protocol previously established (Tran et al. 2014). The first round was a conventional PCR, where one nanogram of genomic DNA was submitted to a preamplification using the species-specific primer (Table 2). Preamplification was performed in a 25 μ L mixture, consisting of 1 ng of total DNA, 2 mM $MgCl_2$, 0.2 μ M of each primer, 200 μ M of each dNTP, 1 U Platinum *Taq* DNA polymerase, 1 X reaction buffer and deionized water. Amplification was carried out in a conventional thermocycler (Mastercycler Personal 5332 Thermocycler - Eppendorf®) according to the following program: initial denaturation at 94 °C for 2 min, followed by 15 cycles of 94 °C for 45 sec, 55 °C for 45 sec and 72 °C for 1 min and a final extension at 72 °C for 1 min.

The second round was the qPCR. The qPCR was carried out in 10 μ L reaction mixtures consisting of 1 μ L of preamplified DNA, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 μ M of each primer, 100 μ M of each dNTP, 0.25 U Platinum *Taq* DNA polymerase, 1 X reaction buffer, 0.1 X SYBR green and deionized water. Samples were amplified and detected

using a StepOne™ Real-Time PCR system (ABI Biosystems Inc.). The qPCR amplification conditions were optimized following the manufacture's recommendation and the thermocycling profile was 95 °C for 2 min, 40 cycles of 95 °C for 15 sec and 60 °C for 30 sec followed by melt curve at 60 °C – 95 °C. All samples were run in triplicate.

Standard Curve

For each enterococcus species was constructed a standard curve for quantitative analysis. Genomic DNA from reference strains *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecium* SS1274 (d'Azevedo et al. 2006), *E. casseliflavus* J1, *E. gallinarum* F1, *E. hirae* C1, and *E. mundtii* J5 (Santestevan et al. 2015) was extracted using the Wizard Genomic Purification Kit (Promega) and quantified by UV spectrophotometer. The concentration of genomic DNA for each enterococcus species was adjusted to 1 ng/μl, serially diluted to 10⁻⁵ and amplified by qPCR. The standard curve was derived from serial dilutions of the genomic DNA and plotted against the CT values. Target copy numbers for each reaction were calculated from the standard curves.

Since the primers used to quantify *E. faecalis* and *E. casseliflavus* target the 16S rRNA and 23S rRNA genes, respectively, an adjustment in copy numbers of these species was used to avoid the overestimation counts of these species.

Sequencing of qPCR amplification

In order to confirm the specificity of the products amplified, an aliquot of qPCR amplification were submitted to nucleotide sequence analysis. Sequencing was carried out with the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems) in an ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (ABI), according to the protocol of the manufacturer. The sequences obtained were compared with homologous nucleotide sequences deposited in the GenBank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Results

All primer sets were tested, adjusted and standardized for the best performance of reactions. The standard curve for each primer had the following efficiencies: *E. casseliflavus* 97.47%; *E. faecalis* 83.98%; *E. gallinarum* 89.79%; *E. mundtii* 101.60%; *E. faecium* 95.7% and *E. hirae* 104.4%. The overall distribution of *Enterococcus* species among fecal samples of wild marine species are shown in Table 3. All *Enterococcus* species evaluated were detected in fecal samples of wild marine species analyzed, and the copy numbers of these species quantification qPCR ranged from 10^6 to 10^{12} copies/ng of total DNA.

The average number of enterococci in genomic DNA from fecal samples of fur seals varied from 2.40×10^{11} to 2.08×10^7 copies/ng of total DNA. Relatively high proportions (2.40×10^{11} to 1.52×10^{11} copies/ng of total DNA) of *E. mundtii* and *E. faecalis* were detected. *Enterococcus gallinarum* showed similar amount in copies (3.24×10^{10} and 6.38×10^{10} copies/ng of total DNA) of both fur seals species. *Enterococcus hirae* and *E. faecium* showed relatively high proportions in Subantarctic (2.01×10^{11} and 2.49×10^9 copies/ng of total DNA) when compared to South American (3.71×10^9 and 7.34×10^8 copies/ng of total DNA). *Enterococcus casseliflavus* was the species with lowest copy number for both fur seals ranging from 10^7 to 10^8 copies/ng of total DNA.

In fecal sample of green turtles, *E. faecalis* was the most commonly encountered species (6.88×10^{11} copies/ng of total DNA), followed by *E. hirae* (3.57×10^{10} copies/ng of total DNA), *E. gallinarum* (3.15×10^{10} copies/ng of total DNA) and *E. mundtii* (5.70×10^9 copies/ng of total DNA). In addition, a small number of *E. faecium* (3.32×10^8 copies/ng of total DNA) and *E. casseliflavus* (5.11×10^7

copies/ng of total DNA) was observed, when compared to other species.

Differences in the enterococci distribution in fecal samples from wild seabirds were observed. In Magellanic penguin samples, *E. faecalis* demonstrated an elevated frequency (2.88×10^{11} copies/ng of total DNA). Other highly species detected include the *E. hirae* (6.31×10^{10} copies/ng of total DNA), *E. mundtii* (2.27×10^{10} copies/ng of total DNA), *E. gallinarum* (2.09×10^9 copies/ng of total DNA), *E. faecium* (3.81×10^8 copies/ng of total DNA) and *E. casseliflavus* (4.66×10^7 copies/ng of total DNA). In snowy-crowned Tern sample, *E. faecalis* was the species most commonly detected (1.25×10^{12} copies/ng of total DNA), followed by *E. mundtii* (1.84×10^{10} copies/ng of total DNA). *Enterococcus gallinarum* (9.63×10^9 copies/ng of total DNA) and *E. faecium* (1.29×10^9 copies/ng of total DNA) showed similar copy number, and *E. casseliflavus* (4.18×10^8 copies/ng of total DNA) and *E. hirae* (3.25×10^6 copies/ng of total DNA) a low frequency.

Changes in the composition of *Enterococcus* species were detected in fecal DNA of white-backed Stilt, where *E. hirae* and *E. gallinarum* showed similar and high proportions, 3.48×10^{10} and 2.98×10^{10} copies/ng of total DNA, respectively, followed by *E. mundtii* (2.54×10^9 copies/ng of total DNA). *Enterococcus faecium* (4.57×10^8) and *E. casseliflavus* (1.17×10^8 copies/ng of total DNA) showed similar copy number and *E. faecalis* the lowest copy number (2.59×10^7 copies/ng of total DNA).

Enterococcus faecium (6.74×10^{10} copies/ng of total DNA) was more frequently observed in fecal samples of white-chinned Petrel, succeed by *E. faecalis* (2.65×10^9 copies/ng of total DNA), *E. mundtii* (1.64×10^8 copies/ng of total DNA), *E. casseliflavus* (9.92×10^7 copies/ng of total DNA). *Enterococcus gallinarum* and *E. hirae* were observed in low copy number 9.38×10^6 and 2.46×10^6 , respectively. In fecal sample of black-browed albatross, *E. faecalis* demonstrated a high occurrence

(2.66×10^{11} copies/ng of total DNA), and *E. casseliflavus* (5.55×10^9 copies/ng of total DNA), *E. faecium* (3.80×10^9 copies/ng of total DNA), and *E. mundtii* (2.51×10^9 copies/ng of total DNA) showed similar frequency. On the other hand, *E. hirae* (1.45×10^6 copies/ng of total DNA) was observed in low copy number. The fecal sample of red knot showed the high frequencies of *E. faecalis* (2.47×10^{12} copies/ng of total DNA), followed by *E. hirae* (2.87×10^{11} copies/ng of total DNA), *E. gallinarum* (4.17×10^{10} copies/ng of total DNA), *E. mundtii* (4.14×10^9 copies/ng of total DNA), *E. faecium* (2.08×10^9 copies/ng of total DNA) and *E. casseliflavus* (1.17×10^8 copies/ng of total DNA).

Discussion

The rationale to evaluate the presence and frequency of enterococci in fecal samples of marine animals was to observe the real diversity of enterococci in fecal samples of these animals, since the methods used to enumerate and to identify enterococci from different samples are culture-based, and these methodologies can underestimate some species; and also to examine the relationships among enterococcus species with feeding behaviors of these animals, which will allow us a better understanding about the presence of enterococci in GI tracts of these animals

The conventional PCR amplification followed by qPCR was used to improve the accuracy and sensitivity of qPCR into quantifies enterococci in fecal DNA from wild marine species. In a malaria study the conventional PCR followed by nested quantitative qPCR provides a 10-fold increase in sensitivity to detect *Plasmodium falciparum* from dried blood spots when compared to qPCR (Tran et al. 2014). In our studies, we choose to performer the preamplification for the following reasons: (i) a small amount of fecal samples (1.5 mL or 0.1g); (ii) a low volume of total DNA used in

qPCR (1 μ L) and, (iii) fecal samples contain a complex mixture of DNAs from individual, different substances derived from food, bacteria and parasites of the host organisms (Goh and Gin 2015).

Quantitative PCR results showed that all enterococci were detected in all fecal samples of marine mammals, sea turtles, and seabirds/shorebirds, with a concentration ranged between 10^6 to 10^{12} copies/ng of total DNA. In aquatic animals, the intestinal microbiota plays an important role in aiding in the digestion of food, producing amino acids and secreting inhibitory substances, like bacteriocins, which inhibit or kill pathogenic bacteria. The intestinal microflora can metabolize several nutrients that hosts cannot digest, converting these to end products, with a direct impact on the digestive physiology and development of animals. They may also play an important role in stimulating the immune system (Lebreton et al. 2014).

In fecal samples of juvenile fur seals the occurrence of enterococci could be related with two main sources. The first source is the breast milk. According to Jiménez et al. (2013), breast milk is a route of transmission of enterococci strains to the gastrointestinal tract of juveniles. The second source is based on the composition of the fur seal diet. These mammals eat myctophid and notothenid fishes, cephalopods and a small number of crustaceans (Vaz-Ferreira and Leon, 1987). Peterson and Dalsgaard (2003) and Klein (2003) detected the presence of enterococci in the intestines of fish and crustaceans, respectively.

The presence of enterococci in fecal samples of sea turtles could also be associated with the animal diets, since young green turtles (*C. mydas*) in the southern Brazilian have an omnivorous diet, which consists mainly of algae (Bugoni et al. 2003; Reisser et al. 2013). Whitman et al. (2003) showed that nuisance green alga *Cladophora* found in both fresh and marine waters, was a source of enterococci.

The eating habits of Magellanic penguins (*S. magellanicus*), black-browed albatross (*T. melanophris*) and white-chinned Petrel (*P. aequinoctialis*) includes fishes, cephalopods and crustaceans (Scolaro et al. 1999, Fonseca et al. 2001; Xavier et al. 2003; BirdLife International 2016). The occurrence of enterococcus species in fecal samples of these animals could also relate with feed habits, due the fact of enterococci have been isolated from the intestines of fish and crustaceans, and the species *E. hirae*, *E. faecalis* and *E. gallinarum* were isolated from echinoderms, invertebrates important in marine food webs (Peterson and Dalsgaard 2003; Klein, 2003; Marinho et al. 2013).

The feeding habits of white-backed Stilt (*H. melanurus*) and snowy-crowned Tern (*S. trudeaui*), are composed by a variety of aquatic invertebrates, particularly insects and crustaceans, as well as small fishes and frogs (Bird Life International, 2016; O'Brien et al. 2006). The diet of red knot (*C. canutus*), a long distance migrating shorebird, includes small invertebrates (mollusks, crustaceans, worms) (O'Brien et al. 2006). The occurrence of enterococci in fecal samples of these birds, could be related with the presence of enterococci in a great diversity of insects and worms, where *E. faecalis* and *E. thfaecium* were predominant but other species occur at lower prevalence (Lebreton et al. 2014). In addition, the marine environment is an immeasurable source of microorganisms from different backgrounds and distinct carrier traits.

Our results demonstrated that *E. mundtii* and *E. faecalis* showed relatively high proportions in fecal DNA of South American and Subantarctic fur seals samples and *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. faecium* and *E. casseliflavus* were also species present. These results are partial in agreement with Layton et al. (2010), that using multiplex-PCR demonstrated that *E. faecalis* was detected in fecal samples of seals

and sea lions from the Marine Mammal Center in Sausalito, CA, nevertheless *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. hirae* and *E. gallinarum* were not observed or detected at low concentrations. This is not surprising, since it is well known that qPCR is more sensible than conventional-PCR. In addition, *E. faecalis* and *E. mundtii* were also not isolated from fecal samples of young wildlife Subantarctic fur seals and *E. gallinarum* and *E. faecium* from South American fur seals (Santestevan et al. 2015). This difference could be related due to the fact that culture-based methods possibly miss the detection of injured or non-viable cells.

All species evaluated were also detected in fecal DNA of green turtles. This result is partial in agreement with some studies that isolated *Enterococcus* species from rectal samples of turtles. For example, *E. faecalis* was the only species isolated from rectal samples of leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*), loggerhead turtle (*Caretta caretta*) and semi-aquatic juvenile European pond turtle (*Emys orbicularis*), and *E. mundtii* and *E. casseliflavus* were not isolated from rectal swabs of green turtle (*C. mydas*) (Santoro et al. 2008; Nowakiewicz et al. 2015; Fichi et al. 2016; Prichulla et al. 2016).

In fecal DNA samples of seabirds/shorebirds, differences in the species distribution were observed, where *E. faecalis* demonstrated a high occurrence in Magellanic penguin, snowy-crowned tern, black-browed albatross, red knot. *Enterococcus hirae* and *E. gallinarum* showed similar numbers in white-backed Stilt and *E. faecium* was more frequently observed in white-chinned petrel. In previous studies, *E. faecalis* was observed as prominent species in cloacal swabs of seabirds, seagulls, in pelicans, ducks, gulls and swans (Petersen and Dalsgaard 2003; Layton et al. 2010; Prichulla et al. 2016). Ryu et al. (2014) using species-specific qPCR assays only reported the presence of *E. faecalis* in fecal samples

collected from red knot (*C. canutus*), ruddy turnstone (*Arenaria interpres*), and semipalmated sandpiper (*Calidris pusilla*). *Enterococcus faecium* has been demonstrated ranging from 40% to 91.8% in birds (Barros et al. 2011; Han et al. 2011; Santos et al. 2013). Barros et al. (2011) isolated *E. faecium* from fecal samples of gilthead seabream (*Sparus aurata*) in the West coast of Portugal. Although *Enterococcus mundtii* was been detected in relatively high amount in fecal samples of wild seabirds, ranged between 10^8 to 10^{10} copies/ng of total DNA, this species has not been very representative in seabirds (Petersen and Dalsgaard 2003; Layton et al. 2010; Barros et al. 2011; Han et al. 2011; Santos et al. 2013). This result should be related due the fact that this species might have been overlapped by another in high number during culture-dependent method.

In conclusion, real-time PCR was very useful tool to detect and to quantify different species of enterococci in total DNA from fecal samples of wild marine species. The results showed highest levels of enterococci diversity in fecal samples of wild marine species than currently available data; and also ensure that cultivation-independent analysis might help us to enhance our understanding about enterococci in GI tracts of wild marine species.

Acknowledgements

We are grateful to Grupo de Estudos de Mamíferos Aquáticos do Rio Grande do Sul and all staff from Center for Coastal Studies, Limnology and Marine (Ceclimar) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul for their help in the data collection.

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil (CNPq - #444335/2014-5, #300912/2012-9, #302421/2012-2 and #303251/2014-0) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de

Pessoal de Nível Superior (CAPES) of the Brazilian government.

References

- Barros, J., Igrejas, G., Andrade, M., Radhouani, H., López, M., Torres, C., Poeta, P. 2011. Gilthead seabream (*Sparus aurata*) carrying antibiotic resistant enterococci. A potential bioindicator of marine contamination? [online] Mar Pollut Bull. **62**(6): 1245-1248. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.03.021
- BirdLife International (2016) Species factsheet: *Sterna trudeaui*. Downloaded from <http://www.birdlife.org> on 22/08/2016. Recommended citation for factsheets for more than one species: BirdLife International (2016) IUCN Red List for birds. Downloaded from <http://www.birdlife.org> on 22/08/2016.
- BirdLife International (2016) Species factsheet: *Procellaria aequinoctialis*. Downloaded from <http://www.birdlife.org> on 22/08/2016. Recommended citation for factsheets for more than one species: BirdLife International (2016) IUCN Red List for birds. Downloaded from <http://www.birdlife.org> on 22/08/2016.
- Bisbal, G.A. 1995. The Southeast South American shelf large marine ecosystem. [Online] Mar Policy. **19**:21–38. doi: 10.1016/0308-597X(95)92570-W
- Bugoni, L., Krause, L., Petry, M.V. 2003. Diet of sea turtles in southern Brazil. Chelonian Conserv Biol. **4**: 685-688.
- Dailey, M.D., Haulena, M., Lawrence, J. 2002. First report of a parasitic copepod (*Pennella balaenopterae*) infestation in a pinniped. J Zoo Wildl Med. **33**:62-65.
- d'Azevedo, P.A., Dias, C.A., Teixeira, L.M. 2006. Genetic diversity and antimicrobial resistance of enterococcal isolates from Southern region of Brazil. [online] Rev Inst Med Trop. **48**:11-16. doi: 10.1590/S0036-46652006000100003.
- Devriese, L., Baele, M., Butaye, P. 2006. The Genus *Enterococcus*: Taxonomy. [online] Prokaryotes. **4**:163-174. doi:10.1007/0-387-30744-3_5.
- Ferguson, D.M., Moore, D.F., Getrich, M.A., Zhouandai, M.H. 2005. Enumeration and speciation of Enterococci found in marine and intertidal sediments and coastal water in southern California. [online] J Appl Microbiol. **99**: 598-608. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02660.x
- Fichi, G., Cardeti, G., Cersini, A., Mancusi, C., Guarducci, M., Di Guardo, G., Terracciano, G. 2016. Bacterial and viral pathogens detected in sea turtles stranded along the coast of Tuscany, Italy. [online] Vet Microbiol. **185**: 56-61. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.02.003
- Fischer, K., Phillips, C. 2009. The Ecology, Epidemiology and Virulence of *Enterococcus*. [online] Microbiology. **155**: 1749-1757. doi: 10.1099/mic.0.026385-0.
- Fonseca, V. S. S., Petry, M.V., Jost, A.H. 2001. Diet of the Magellanic Penguin on the Coast of Rio Grande do Sul, Brazil. Waterbirds. **24**(2): 290-293.
- Fredricks, D.N., Relman, D.A. 1998. Improved amplification of microbial DNA from blood cultures by removal of the PCR inhibitor sodium polyanetholesulfanate. J Clin Microbiol. **36**(10): 2810-2816.
- Geraci, J.R., Lounsbury, V.J. 2005. Marine mammals ashore: a field guide for stranding. National Aquarium in Baltimore.

- Gilmore, M.S., Clewell, D.B., Ike, Y., Shankar, N. 2014. *Enterococcus*: Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization in Enterococci from Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection. Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston. [online] **71**: 2250-225. doi: 10.1128/AEM.71.5.2250-2255.2005
- Goh, S.G., Gin, K.Y.H. 2015. The effects of pretreatments on qPCR detection of bacteria–bacteria indicator, *Enterococcus* as a model. [online] *J Microb Biochem Technol* **7**: 124-132. doi:10.4172/1948-5948.1000193
- Han, D., Unno, T., Jang, J., Lim, K., Lee, S.N., Ko G., Sadowsky, M.J., Hur, H.G. 2011. The occurrence of virulence traits among high-level aminoglycosides resistant *Enterococcus* isolates obtained from feces of humans, animals, and birds in South Korea. [online] *Int J Food Microbiol.* **144**: 387–390. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.024.
- He J.W., Jiang S. 2005. Quantification of Enterococci and human adenovirus in environmental samples by real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* **71**: 2250-225. doi: 10.1128/AEM.71.5.2250-2255.2005
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M. 1996. Real time quantitative PCR. [online] *Genome Res.* **6**(10): 986-994. doi: 10.1101/gr.6.10.986
- Jackson, C.R., Fedorka-Cray, P.J., Barrett, J.B. 2004. Use of a genus- and species-specific multiplex pcr for identification of enterococci. [online] *J Clin Microbiol.* **42**: 3558-3565. doi: 10.1128/JCM.42.8.3558-3565.2004
- Jiménez, E., Ladero, V., Chico, I., Maldonado-Barragán, A., López, M., Martín, V., Fernández, L., Fernández, M., Álvarez, M.A., Torres, C., Rodríguez, J.M. 2013. Antibiotic resistance, virulence determinants and production of biogenic amines among enterococci from ovine, feline, canine, porcine and human Milk. [online] *BMC Microbiology.* **13**(288). doi: 10.1186/1471-2180-13-288
- Johnson, S.P, Nolan, S., Gulland, F.M. 1998. Antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from pinnipeds stranded in central and northern California. *J Zoo Wild Med.* **29**:288-294.
- Klein, G. 2003. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. [online] *Int. J. Food Microbiol.* **88**: 123-131
- Kniff, E., Dellaglio, F., Lombardi, A., Andrighetto, C., Torriani, S. 2001. Rapid Identification of *Enterococcus durans* and *Enterococcus hirae* by PCR with primers targeted to the *ddl* genes. [online] *J Microbiol Meth.* **47**: 35-40. doi:10.1016/S0167-7012(01)00297-4
- Layton, B.A., Walters, S.P., Lam, L.H., Boehm, A.B. 2010. *Enterococcus* species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR. [online] *J Appl Microbiol.* **109**: 539–547. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04675.x
- Lebreton, F., Willems, R.J.L., Gilmore, M.S. 2014. *Enterococcus* Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. In Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, *et al* (ed) *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston, MA. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190427/>.
- Lehner, A., Loy, A., Behr, T., Gaenge, H., Ludwig, W., Wagner, M., Schleifer, M. 2005. Oligonucleotide microarray for identification of *Enterococcus* species. [online] *FEMS Microbiol Lett.* **246**: 133–142. doi: 10.1016/j.femsle.2005.04.002
- Mac, K., Wichmann-Schauer, H., Peters, J., Ellerbroek, L. 2003. Species

- identification and detection of vancomycin resistance genes in enterococci of animal origin by multiplex PCR. [online] *Int J Food Microbiol.* **88**: 305-309. doi:10.1016/S0168-1605(03)00192-2
- Marinho, C., Silva, N., Pombo, S., Santos, T., Monteiro, R., Gonçalves, A., Micael, J., Rodrigues, P., Costa, A., Igrejas, G., Poeta, P. 2013. Echinoderms from Azores islands: an unexpected source of antibiotic resistant *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* isolates. [online] *Mar Pollut Bull.* **69**:122-27. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.01.017
- Nowakiewicz, A., Ziółkowska, G., Zięba, P., Dziedzic, B.M., Gnat, S., Wójcik, M., Dziedzic, R., Kostruba, A. 2015. Aerobic bacterial microbiota isolated from the cloaca of the european pond turtle (*Emys orbicularis*) in Poland. [online] *J Wildlife Dis.* **51**(1): 255-259. doi: 10.7589/2013-07-157
- O'Brien, M., Crossley, R., Karlson, K. T. 2006. The shorebird guide. Boston and New York: Houghton Mifflin. 477 p
- Petersen, A., Dalsgaard, A. 2003. Species composition and antimicrobial resistance genes of *Enterococcus* spp., isolated from integrated and traditional fish farms in Thailand. *Environ. Microbiol.* **5**: 395–402.
- Poeta, P., Costa, D., Sáenz, Y., Klibi, N., Ruiz-Larrea, F., Rodrigues, J., Torres, C. 2005. Characterization of antibiotic resistance genes and virulence factors in fecal *enterococci* of wild animals in Portugal. [online] *J Vet Med B.* **52**: 396-402. doi: 10.1111/j.1439-0450.2005.00881.x
- Prichulla, J., Pereira, R.I., Wachholz, G., Cardoso, L.A., Tolfo, N.C.C., Santestevan, N.A., Medeiros, A.W., Tavares, M., Frazzon, J., d'Azevedo, P., Frazzon, A.P.G. 2016. Resistance to antimicrobial agents among enterococci isolated from fecal samples of wild marine species in the southern coast of Brazil. [online] *Mar Poll Bull.* **105**(1):51-57. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.02.071
- Reisser, J., Proietti, M., Sazima, I., Kinan, P., Horta, P., Secchi, E. 2013. Feeding ecology of the green turtle (*Chelonia mydas*) at rocky reefs in western South Atlantic. [online] *Mar Biol.* **160**: 3169-3179. doi: 10.1007/s00227-013-2304-7
- Ryu, H., Grond, K., Verheijen, B., Elk, M., Buehler, D.M., Santo Domingo, J.W. 2014. Intestinal microbiota and species diversity of *Campylobacter* and *Helicobacter* spp. in migrating shorebirds in delaware Bay. [online] *Appl Environ Microbiol.* **80**: 1838-1847. doi:10.1128/AEM.03793-13
- Santestevan, N.A., Zvoboda, D.A., Prichulla, J., Pereira, R.I., Wachholz, G.R., Cardoso, L.A., Moura, T.M., Medeiros, A.W., Amorin, D.B., Tavares, M., d'Azevedo, P.A., Franco, A.C., Frazzon, J., Frazzon, A.P.G. 2015. Antimicrobial resistance and virulence factor gene profiles of *Enterococcus* spp. isolates from wild *Arctocephalus australis* (South American fur seal) and *Arctocephalus tropicalis* (Subantarctic fur seal). [online] *World J Microbiol Biotechnol.* **31**(12): 1935-46. doi: 10.1007/s11274-015-1938-7
- Santoro, M., Hernández, G., Caballero, M., García, F. 2008. Potential bacterial pathogens carried by nesting leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) in Costa Rica. [online] *Chelonian Conservation and Biology.* **7**(1):104-108. doi: 10.2744/CCB-0666.1, 2008
- Santos, T., Silva, N., Igrejas, G., Rodrigues, P., Micael, J., Rodrigues, T., Resendes, R., Gonçalves, A., Marinho, C., Gonçalves, D., Cunha, R., Poeta, P. 2013. Dissemination of antibiotic resistant *Enterococcus* spp. and *Escherichia*

- coli* from wild birds of Azores Archipelago. [online] *Anaerobe*. **24**: 25-31. doi:10.1016/j.anaerobe.2013.09.004
- Scolaro, J. A., Wilson R. P., Laurenti, S., Kierspel, M., Gallelli H., Upton, J.A. 1999. Feeding preferences of the Magellanic Penguin over its breeding range in Argentina. *Waterbirds*. **22**: 104-110
- Sedgley, C.M., Lennan, S.L., Appelbe, O.K. 2005. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo. [online] *Int Endod J*. **38**: 735–742. doi: 10.1111/j.1365-2591.2005.01009.x
- Seeliger, U., Odebrecht, C., Castello, J.P. 1997. Subtropical Convergence Environments – the Coast and Sea in the Southwestern Atlantic. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Shin Giek Goh, S.G., Gin, K.Y. 2015. The effects of pretreatments on qPCR detection of bacteria – bacteria indicator, *Enterococcus* as a model. [online] *J Microb Biochem Technol*. **7**(2): 124-13. doi:10.4172/1948-5948.1000193
- Thornton, S.M., Nolan, S. and Gulland, F.M. 1998. Bacterial isolates from California sea lions (*Zalophus californianus*), harbor seals (*Phoca vitulina*), and northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*) admitted to a rehabilitation center along the central California coast, 1994-1995. *J Zoo Wildlife Med*. **29** (2): 171-176.
- Tran, T.M., Aghili, A., Li, S., Ongoiba, A., Kayentao, K., Doumbo, S., Traore B., Crompton, P.D. 2014. A nested real-time PCR assay for the quantification of *Plasmodium falciparum* DNA extracted from dried blood spots. [online] *Malar J*. **13**:393. doi: 10.1186/1475-2875-13-393.
- Vaz-Ferreira, R., Leon, A.P. 1987. South American fur seal, *Arctocephalus australis*, in Uruguay. In Status, biology and ecology of fur seals. National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA). Technical Report. National Marine Fisheries Service (NMFS), Croxall, JP & Gentry, RL (editors), v.51, p. 29-32, Montevideo, Uruguay.
- Whitman, R.L., Shively, D. A., Pawlik, H., Nevers, M.B., Byappanahalli, M.N. 2003. Occurrence of *Escherichia coli* and Enterococci in cladophora (*Chlorophyta*) in Nearshore water and beach sand of Lake Michigan. [online] *Appl Environ Microbiol*. **69**: 4714–4719. doi: 10.1128/AEM.69.8.4714–4719.2003
- Xavier, J. C., Croxall, J. P., Reid, K. 2003. Interannual variation in the diets of two albatross species breeding at South Georgia: implications for breeding performance. *Ibis* **145**: 593-610.

Table 1. Details of the wild marine species analyzed in this study

Sample ID ¹	Species	Sex ²	Age	Mass (Kg)	Samples types	Code ³		
marine mammals	<i>Arctocephalus australis</i>	ND	Juvenile	NA	Feces	1		
	A –M2	<i>Arctocephalus australis</i>	M	Juvenile	16	Feces	2	
	A- G1508	<i>Arctocephalus australis</i>	F	Juvenile	8.90	Feces	2	
	A-G1516	<i>Arctocephalus australis</i>	M	Juvenile	9.50	Feces	2	
	A-G1521	<i>Arctocephalus australis</i>	M	Juvenile	14.70	Feces	2	
	A- G1525	<i>Arctocephalus australis</i>	M	Juvenile	15.20	Feces	3	
	A- G1534	<i>Arctocephalus australis</i>	F	Juvenile	11.20	Feces	2	
	A- G1527	<i>Arctocephalus tropicalis</i>	M	Juvenile	8.40	Feces	2	
	T- G1535	<i>Arctocephalus tropicalis</i>	M	Juvenile	9.00	Feces	2	
	T- G1537	<i>Arctocephalus tropicalis</i>	M	Juvenile	8.80	Feces	2	
	T- G1561	<i>Arctocephalus tropicalis</i>	M	Juvenile	7.10	Feces	3	
	T- G1577	<i>Spheniscus magellanicus</i>	I	Juvenile	2.13	Cloacal swabs	2	
	Seabirds/ shorebird	P-AM694	<i>Spheniscus magellanicus</i>	ND	Juvenile	NA	Cloacal swabs	1
		P-M1	<i>Spheniscus magellanicus</i>	I	Juvenile	1.91	Cloacal swabs	1
P-3325		<i>Spheniscus magellanicus</i>	ND	Juvenile	NA	Cloacal swabs	1	
P-M3		<i>Himantopus melanurus</i>	F	Adult	0.23	Cloacal swabs	2	
BS-AM705								

	BA-AM709	<i>Thalassarche melanophris</i>	M	Adult	0.16	Cloacal swabs	2
	CT-AM706	<i>Stema trudeaui</i>	F	Adult	2.26	Cloacal swabs	2
	CP-AM711	<i>Procellaria aequinoctialis</i>	F	Adult	1.14	Cloacal swabs	2
	K-1708	<i>Calidris canutus</i>	ND	Adult	NA	Cloacal swabs	1
	CP- AM712	<i>Procellaria aequinoctialis</i>	F	Adult	1.00	Cloacal swabs	2
sea turtles	T-3396	<i>Chelonia mydas</i>	I	Juvenile	5.34	Rectal swabs	1
	T-3395	<i>Chelonia mydas</i>	I	Juvenile	3.74	Rectal swabs	1
	T- 3399	<i>Chelonia mydas</i>	I	Juvenile	3.23	Rectal swabs	1

1. SA- South American fur seals; SB- Subantarctic fur seals; MP – Magellanic penguin; WBS – white-backed Stilt; BBA- black-browed albatross; SCT – snowy-crowned Tern; WCP- white-chinned Petrel; RK- red knot; GT- green turtle. 2: I: indeterminate; M: male, F: female. 3: Code based on Geraci and Lounsbury (2005). ND – Not determined; NA- Not available.

Table 2. Primers used in the pre amplification and qPCR carried out in this study

Specie	Sequence 5'-3'	Amplicon length (bp)	Target gen	Reference
<i>E. faecalis</i>	CCGAGTGCTTGCACTCAATTGG CTCTTATGCCATGCGGCATAAAC	138	16S	Sedgley et al. 2005
<i>E. faecium</i>	TTGAGGCAGACCAGATTGACG CGGAAGTGATGCTTCCTACTG	172	<i>ddl</i>	Mac et al. 2003 This study
<i>E. hirae</i>	TTATGTCCCWGTWTTGAAAAATCAA TATTGATAAGCTAATGCAAGCGC	180	<i>ddl</i>	Kniff et al. 2001
<i>E. mundtii</i>	CAGACATGGATGCTATTCCATCT GCCATGATTTTCCAGAAGAATG	94	<i>sodA</i>	Jackson et al. 2004
<i>E. casseliflavus</i>	TAGGATGT TAC GTCTGC GTG CTGAATAGACTACCATATCGG	139	23S	Lehner et al. 2005 This study
<i>E. gallinarum</i>	TTACTTGCTGATTTTGATTCTG TGAATTCTTCTTTGAAATCAG	173	<i>sodA</i>	Jackson et al. 2004

Table 3. Copy number (log) of enterococci species in fecal DNA of wild marine species

Species	marine mammals (n)		sea turtles		seabirds (n)				
	SA ¹ (7)	SB ² (4)	GT ³ (3)	MP ⁴ (4)	SCT ⁵ (1)	WBS ⁶ (1)	WCP ⁷ (2)	BBA ⁸ (1)	RK ⁹ (1)
<i>E. faecalis</i>	1.52x10 ¹¹	2.30x10 ¹¹	6.88x10 ¹¹	2.88x10 ¹¹	1.25x10 ¹²	2.59x10 ⁷	2.65x10 ⁹	2.66x10 ¹¹	2.47x10 ¹²
<i>E. faecium</i>	7.34x10 ⁸	2.49x10 ⁹	3.32x10 ⁸	3.81x10 ⁸	1.29x10 ⁹	4.57x10 ⁸	6.74x10 ¹⁰	3.80x10 ⁹	2.08x10 ⁹
<i>E. hirae</i>	3.71x10 ⁹	2.01x10 ¹¹	3.57x10 ¹⁰	6.31x10 ¹⁰	3.25x10 ⁶	3.48x10 ¹⁰	2.46x10 ⁶	1.45x10 ⁶	2.87x10 ¹¹
<i>E. casseliflavus</i>	1.21x10 ⁸	2.08x10 ⁷	5.11x10 ⁷	4.66x10 ⁷	4.18x10 ⁸	1.17x10 ⁸	9.92x10 ⁷	5.55x10 ⁹	1.17x10 ⁸
<i>E. mundtii</i>	2.40x10 ¹¹	1.54x10 ¹¹	5.70x10 ⁹	2.27x10 ¹⁰	1.84x10 ¹⁰	2.54x10 ⁹	1.64x10 ⁸	2.51x10 ⁹	4.14x10 ⁹
<i>E. gallinarum</i>	3.24x10 ¹⁰	6.38x10 ¹⁰	3.15x10 ¹⁰	2.09x10 ⁹	9.63x10 ⁹	2.98x10 ¹⁰	9.38x10 ⁶	7.90x10 ⁸	4.17x10 ¹⁰

1. SA- South American fur seals; 2. SB- Subantartic fur seals; 3. GT- green turtle; 4. MP – Magellanic penguin; 5. SCT – snowy-crowned Tern; 6. WBS – white-backed Stilt; 7. WCP- white-chinned Petrel; 8. BBA- black-browed albatross; 9. RK- red knot.

5. DISCUSSÃO GERAL

Procaríotos são os organismos mais fisiologicamente diversos e metabolicamente versáteis em nosso planeta, sendo os microrganismos que conhecemos uma pequena parte de um vasto universo, já que a maioria não pode ser cultivada em laboratório (Sabree *et al.* 2009). Nesse sentido, análises genômicas independentes de cultivo vêm tornando-se importantes ferramentas no entendimento da história evolutiva e funcional e da biodiversidade ecológica (Shokralla *et al.* 2012). Esses métodos permitem uma visão mais completa do cenário da comunidade microbiana levando a um melhor entendimento desses sistemas (Singh *et al.* 2008).

A identificação de microrganismos em uma comunidade complexa pode ser alcançada através da análise de alvos universais e conservados como os genes que codificam o *rRNA*, através da amplificação de regiões específicas dentro desses genes (Petrosino *et al.* 2009). Aliado a isso, o advento do sequenciamento de nova geração permitiu a elucidação de centenas de espécies presentes em uma variedade de ambientes através da tecnologia de bibliotecas de DNA barcode (Shokralla *et al.* 2012).

Definir a diversidade microbiana do trato gastrointestinal é de grande importância na determinação do metabolismo do hospedeiro e na sua saúde. A microbiota tem papel importante na fermentação de carboidratos indigeríveis, síntese de vitaminas, captação e biotransformação de nutrientes e desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro (Smith *et al.* 2013).

A importância do estudo da microbiota de animais marinhos, em particular, se deve ao fato de existirem poucos estudos utilizando amostras de animais que não tenham sofrido intervenções em centros de reabilitação. Pesquisas empregando animais marinhos silvestres não são muito frequentes, provavelmente,

devido à dificuldade em se obter amostras desses animais. O conhecimento sobre a microbiota de animais em geral fornece uma base que pode ser usada para comparação em virtude de mudanças futuras.

Dentre os estudos já publicados utilizando sequenciamento de última geração no estudo da microbiota de animais marinhos está o de Nelson *et al.* (2013) que defende a possibilidade de aquisição de amplo conhecimento através da comparação de uma gama de diversos mamíferos com diferentes desenvolvimentos históricos. Em seu estudo a microbiota de diferentes mamíferos terrestres e marinhos, dentre eles alguns espécimes da família *Phocidae*, foi comparada com o objetivo de entender o padrão da comunidade microbiana. Apesar das diferenças metodológicas, nossos dados podem ser somados aos desse estudo para o entendimento da fisiologia de mamíferos marinhos, atentando para diferenças geográficas, intrínsecas à espécie analisada, entre outras. Nossos dados encontrados através do sequenciamento de última geração dos lobos-marinhos também podem ser relacionados aos dados encontrados no estudo de Smith *et al.* (2013) para uma comparação relacionada a diferentes espécies de lobos e localizações geográficas. Através da soma das informações disponíveis sobre a microbiota de mamíferos marinhos foi possível observar uma tendência de distribuição, onde assim como em outros mamíferos, Firmicutes aparece como o filo mais proeminente, já outros filios mostram uma variação que pode estar relacionada a vários fatores como aos hábitos migratórios, filogenia e dieta.

A análise de comunidades bacterianas utilizando sequenciamento de nova geração muitas vezes não é capaz de elucidar com confiança as espécies presentes na amostra. Nesse sentido, a PCR em tempo real quantitativa (qPCR) é um método que permite a detecção e quantificação de genes alvos específicos na

bactéria de interesse, e pode ser usada na pesquisa de espécies bacterianas específicas. Devido a precisão e sensibilidade da qPCR, bactérias presentes em pequeno número em culturas mistas podem ser detectadas, o limiar de detecção tem sido demonstrado entre 10^1 e 10^8 células (Heid *et al.* 1996).

A quantificação de *Enterococcus* vem sendo empregada principalmente na avaliação da qualidade da água, já que esse microrganismo é considerado um bioindicador de contaminação fecal (Ryu *et al.* 2013). Esses microrganismos são considerados ubíquos e sua presença pode apontar aspectos importantes a respeito das interações e distúrbios ambientais. Os enterococos são membros da microbiota de uma variedade de animais e humanos, apesar disso, eles podem atuar como patógenos oportunistas através da translocação pela barreira mucosa para outros tecidos podendo causar infecções sistêmicas. Além disso, eles apresentam uma grande capacidade em adquirir determinantes de virulência e resistência graças aos seus diferentes mecanismos de transferência de DNA (Gilmore 2014, Kristich *et al.* 2014, Lebreton *et al.* 2014, Paradella *et al.* 2007).

Gilmore *et al.* 2013, propuseram a transição de enterococos de comensais para patógenos demonstrando a inativação de genes que são importantes para o crescimento em um ambiente competitivo como o trato gastrointestinal, mas que não são requeridos em um ambiente não competitivo criado pelo uso de antimicrobianos que suprimem uma grande parte da microbiota presente. No mesmo estudo, Gilmore *et al.* (2013) também levantam a questão de que *Enterococcus* estão presentes em uma gama de animais, incluindo insetos, podendo misturar-se através da cadeia alimentar criando uma conexão tênue entre a produção de antibióticos e resistência no solo e a resistência a antibióticos em linhagens de enterococos adaptadas a mamíferos.

A coleta de amostras de animais marinhos silvestres muitas vezes resulta em pequeno volume, o que pode acarretar impossibilidade de recuperação das cepas bacterianas, desse modo, qPCR é uma ferramenta útil para a definição das espécies bacterianas presentes nas fezes de animais marinhos, dispensando as etapas de isolamento e identificação fenotípica dos isolados. Além disso, os meios de cultura utilizados nas etapas de isolamento podem beneficiar alguma espécie bacteriana em detrimento a outra. Por outro lado, a amplificação de DNA diretamente da amostra não permite estudos posteriores com relação ao perfil de sensibilidade a antimicrobianos, por exemplo, porém a presença de determinantes de virulência e resistência também pode ser determinado por qPCR diretamente do DNA extraído da amostra.

6. CONCLUSÃO

Através do sequenciamento de nova geração foi possível definir um panorama da microbiota fecal de lobos-marinhos-sul-americanos e lobos-marinhos-subantárticos, que demonstrou similaridades entre essas duas espécies em relação aos filos presentes, onde Firmicutes foi o filo predominante, seguido por Actinobacteria e Proteobacteria. Apesar da tendência em relação a composição da microbiota, foram observadas variações inter-individuais que pode ser relacionada a diversos fatores.

A qPCR foi uma ferramenta útil na quantificação das espécies mais prevalentes de *Enterococcus* em animais marinhos, demonstrando que *E. faecalis* foi a espécie mais prevalente em todos os animais analisados. Através da comparação dos resultados obtidos pela auto-nested qPCR com estudos utilizando metodologia de cultivo tradicional demonstrou-se que espécies que apresentam maior prevalência podem estar sobrepujando espécies em menor quantidade.

7. REFERÊNCIAS

- Almeida AP, Santos AJB, Thomé JCA, Belini C, Baptistotte C, Marcovaldi MA, Santos AS, Lopez M. 2011. Avaliação do Estado de Conservação da Tartaruga Marinha *Chelonia Mydas* (Linnaeus, 1758) no Brasil. *Biodiversidade Brasileira*. 1:12 -19.
- Alves MAS. 2007. Sistemas de Migrações de Aves em Ambientes Terrestres no Brasil: Exemplos, Lacunas e Propostas para o Avanço do Conhecimento. *Revista Brasileira De Ornitologia*. 15(2): 231-238.
- Barros JA, Copertino MS, Monteiro DS, Estima SC. 2007. Análise da Dieta de Juvenis de Tartaruga Verde (*Chelonia Mydas*) no Extremo Sul do Brasil. *Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil*. Caxambu – MG.
- Bellini C, Marcovaldi MA, Sanches TM, Grossman A, Sales G. 1996. Atol das Rocas Biological Reserve: second largest *Chelonia* rookery in Brazil. *Mar Turtle News*. 72:1-2.
- Bellini C, Sanches TM. 1996. Reproduction and feeding of marine turtles in the Fernando de Noronha Archipelago, Brazil. *Mar Turtle News*. 74: 12-13.
- Bester MN, Ryan PG, Visagie J. 2009. Summer survey of fur seals at Prince Edward Island, southern Indian Ocean. *African Journal of Marine Science*. 31: 451-455.
- Bester MN, Wilson JW, Burle MH, Hofmeyr GJG. 2006. Population trend of Subantarctic fur seals at Gough Island. *South Afr J Wildlife Res*. 36: 191-194.
- Bogomolni AI, Gast RJ, Ellis JC, Dennett M, Pugliares KR, Lentell BJ, Moore MJ. 2008. Victims or Vectors: A Survey of Marine Vertebrate Zoonoses from Coastal Waters of the Northwest Atlantic. *Dis Aquat Org*. 81:13–38.
- CECLIMAR – Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos. Instituto de Biociências, UFRGS. Imbé, Rio Grande do Sul. Disponível em <<http://www.ufrgs.br/ceclimar>>. Acesso em 01 de dezembro de 2014.
- Colares FAP. 1999. **Nutrição de mamíferos Aquáticos**. Tese (Doutorado em Ciência Animal)- UFMG, Belo Horizonte.
- Dewar M. 2012. **Gastrointestinal Microbiota of Seabirds**. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Deakin University, Australia.
- Euzéby, JP. **List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature: A Folder Available on the Internet. Genus Enterococcus**. 2010. *Int. J. Syst. Bacteriol*. Disponível em <<http://www.Bacterio.Net/Enterococcus.Html>>. Acesso em 27 Maio 2014.
- Fischer K, Phillips C. 2009. The Ecology, Epidemiology and Virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*. 155:1749-1757.
- Fleming LE, Broad K, Clement A, Dewailly E, Elmir S, Knap A, Pomponi SA, Smith S, Gabriele HS, Walsh P. 2006. Oceans and Human Health: Emerging Public Health Risks in The Marine Environment. *Mar Poll Bull*. 53:545–560.
- Geraci JR, Lounsbury VJ. 2005. **Marine Mammals Ashore: A Field Guide for Strandings**. **National Aquarium in Baltimore**. Baltimore. 2:177-188.
- Gilmore MS, Lebreton F, Schaik W. 2013. Genomic transition of enterococci from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. *Curr Opin Microbiol*. 16:10–16.
- Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N. 2014. **Enterococcus Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization in Enterococci from Commensals to Leading Causes Of Drug Resistant Infection**. Massachusetts Eye and Ear Infirmary. Boston.

- Giraffa G. 2002. Enterococci in Foods. *FEMS Microbiol.* 26:163-171.
- Grossman A, Bellini C, Marcovaldi MA. 2003. Reproductive biology of the green turtle at the Biological Reserve of Atol das Rocas off northeast Brazil. 2002. In: Proceedings of the 22nd Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation. NOAA.
- Guinet C, Jouventin P, Georges JY. 1994. Long term population changes of fur seals *Arctocephalus gazella* and *Arctocephalus tropicalis* on subantarctic (Crozet) and subtropical (St. Paul and Amsterdam) Islands and their possible relationship to El Niño Southern Oscillation. *Antarct Sci.* 6(4):473-478.
- Hamann M, Godfrey MH, Seminoff JA, Arthur K, Barata PCR, Bjorndal KA, Bolten AB, Broderick AC, Campbell LM, Carreras C, Casale P, Chaloupka M, Chan SKF, Coyne MS, Crowder LB, Diez CE, Dutton PH, Epperly SP, Fitzsimmons NN, Formia A, Girondot M, Hays GC, Ijiunn C, Kaska Y, Lewison R, Mortimer JA, Nichols WJ, Reina RD, Shanker K, Spotila JR, Tomás J, Wallace BP, Work TM, Zbinden J, Godley BJ. 2010. Global research priorities for sea turtles: informing management and conservation in the 21st century. *Endangered Species Research.* 11: 245-269.
- Hand D, Wallis C, Colyer A, Penn CW. 2013. Pyrosequencing the canine faecal microbiota: breadth and depth of biodiversity. *PloSOne.* DOI:10.1371/journal.pone.0053115.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6(10): 986-994.
- Higdon JW, Bininda-Emonds ORP, Beck RMD, Ferguson SH. 2007. Phylogeny and divergence of the pinnipeds (Carnivora: Mammalia) assessed using a multigene dataset. *BMC Evolutionary Biology.* 7:216-235.
- Hofmeyr G, Kovacs K. (**IUCN SSC Pinniped Specialist Group 2008**) ***Arctocephalus tropicalis***. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org/details/2062/0>. Acesso em: 25 Nov 2014.
- Hofmeyr GJG, Bester MN, Makhado AB, Pistorius PA. 2006. Population changes in Subantarctic and Antarctic fur seals at Marion Island. *South Afr J Wildlife Res* 36(1): 55-68.
- Islam S, Tanaka M. 2004. Impacts of Pollution on Coastal and Marine Ecosystems Including Coastal and Marine Fisheries and Approach for Management: A Review and Synthesis. *Mar Poll Bull.* 48:624-649,.
- IUCN. Internacional Union for Conservation of Nature. **The IUCN Red List of Threatened Species 2015**. Version 2015. Disponível em <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 15 dezembro 2015
- IUCN. Internacional Union for Conservation of Nature. **The IUCN Red List of Threatened Species 2013**. Version 2013.2. Disponível em <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 10 junho 2014
- Kayser FH. 2003. Safety Aspects of Enterococci from the Medical Point of View. *Int J Food Microbiol.*88:255-262.
- Klein G. 2003. Taxonomy, Ecology and Antibiotic Resistance of Enterococci from Food and the Gastro-Intestinal Tract. *Int J Food Microbiol.* 88:123-131.
- Kostic AD, Howitt MR, Garrett WS. 2013. Exploring host-microbiota interactions in animal models and humans. *Genes Dev.* 27:701-718.
- Kristich CJ, Rice LB, Arias CA. 2014. **Enterococcal Infection -Treatment and Antibiotic Resistance** In Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, *et al.*, editors. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*

- [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary.
- Lebreton F, Willems RJL, Gilmore MS. 2014. **Enterococcus Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization**. In Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, *et al.*, editors. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary.
- Ley RE, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh P, Ramey RR, Bircher JS, Schlegel ML, Tucker TA, Schrenzel MD, Knight R, Gordon JI. 2008. Evolution of Mammals and Their Gut Microbes. *Science*. 320:1647-1651.
- Linhares MB, Beneditto APM. 2005. Parasitismo e Hábito Alimentar do Pinguim-De - Magalhães (*Spheniscus Magellanicus*, Forster, 1781) em Arraial Do Cabo / RJ. VII Congresso De Ecologia Do Brasil. Caxambu – MG.
- Mäder A, Sander M, Casa G. 2010. Ciclo Sazonal de Mortalidade do Pinguim-de-Magalhaes, *Spheniscus Magellanicus* Influenciado por Fatores Antrópicos e Climáticos na Costa do Rio Grande Do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Ornitologia*. 18(3):228-233.
- Mäder A. 2011 **Conservação de Aves Migratórias Neárticas no Brasil- Litoral Norte Do Rio Grande Do Sul**. 1a Edição Conservação Internacional. Belém.
- Monteiro DS, Estima SC, Junqueira SP, Bugoni L, Gandra TBR. 2005. **Ocorrência de *Chelonia mydas* e interação com a pesca artesanal no interior do estuário da Lagoa dos Patos – RS**. In: Livro de Resumos dall Jornada de Conservação e Pesquisa de Tartarugas Marinhas no Atlântico Sul Ocidental. NEMA/FURG.
- Moreira LMP, Baptistotte C, Scalfoni J, Thomé JC, Almeida APLS. 1995. Occurrence of *Chelonia mydas* on the island of Trindade, Brazil. *Mar Turtle News*. 70(2).
- Müller A, Barros MP. 2013. Diversidade e abundância de aves costeiras em um trecho do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. *Biotemas*. 26(3): 163-175.
- Murray BE. 1990. The Life and Times of the Enterococcus. *Clinical Microbiology Reviews*. 3(1): 46-65.
- Nakashima SB. 2008. **Dieta da Tartaruga-Verde *Chelonia Mydas* Linnaeus, 1758 (Testudines, Cheloniidae) no Litoral Norte do Rio Grande Do Sul**. Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica Do Rio Grande Do Sul.
- Nelson TM, Rogers TL, Brown MV. 2013. The Gut Bacterial Community of Mammals from Marine and Terrestrial Habitats. *Plos one*. 8(12).
- Ogier JC, Serror P. 2008. Safety Assessment of Dairy Microorganisms: The Enterococcus Genus. *Int J Food Microbiol*. 126: 291-301.
- Oliveira AJFC, Pinhata JMW. 2008. Antimicrobial Resistance and Species Composition of Enterococcus spp. Isolated from Waters and Sands of Marine Recreational Beaches In Southeastern Brazil. *Water Res*. 42:2242 – 2250.
- Oliveira LR. 2013. **Carnívoros Marinhos**. In Weber MM, Roman C, Cáceres NC (orgs.). *Mamíferos do Rio Grande do Sul*. Ed. UFSM, p.405-429,.
- Paradella TC, Koga-Ito CY, Jorge AOC. 2007. Enterococcus faecalis: considerações clínicas e microbiológicas. *Revista de Odontologia da UNESP*. 36(2):163-168.
- Petrosino JF, Highlander S, Luna RA, Gibbs RA, Versalovic J. 2009. Metagenomic Pyrosequencing and Microbial Identification. *Clin Chem*. 55:856-866..
- Petry MV, Scherer JFM, Scherer AL. 2012. Ocorrência, Alimentação e Impactos Antrópicos de Aves Marinhas nas Praias do Litoral do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira De Ornitologia*. v.20(1): 65-70.
- Poloczanska ES, Limpus CJ, Hays GC. 2009. Vulnerability of marine turtles to climate change. *Adv Mar Biol*. 56:151-211.

- Prichulla J, Pereira RI, Wachholz G, Cardoso LA, Tolfo NCC, Santestevan NA, Medeiros AW, Tavares M, Frazzon J, d'Azevedo P, Frazzon APG. 2016. Resistance to antimicrobial agents among enterococci isolated from fecal samples of wild marine species in the southern coast of Brazil. *Mar Poll Bull* (inpress) doi:10.1016/j.marpolbul.2016.02.071
- Rocha-Campos CC, Câmara IG (org.). 2011. **Plano de ação nacional para conservação dos mamíferos aquáticos: grandes cetáceos e pinípedes**. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, ICMBio, Brasília. 156 p.
- Ryu H, Henson M, Elk M, Toledo-Hernandez C, Griffith J, Blackwood D, Noble R, Gourmelon M, Glassmeyer S, Santo Domingo JW. 2013. Development of Quantitative PCR Assays Targeting the 16S rRNA Genes of *Enterococcus* spp. and Their Application to the Identification of *Enterococcus* Species in Environmental Samples. *Appl Environ Microbiol* 79(1): 196-204.
- Sabree, Z. L., Rondon, M. R., & Handelsman, J. 2009. Metagenomics. *Encyclopedia of Microbiology*, 622-632.
- Sales G, Lopez GG, Santos AS, Vianna P, Serafini TZ. 2007. **Captura incidental de tartarugas marinhas na pesca artesanal registrada pelo Projeto TAMAR-IBAMA no litoral norte da Bahia, Brasil**. In: Anais do XII Congresso Latino-Americano de Ciências do Mar. Associação Brasileira de Oceanografia.
- Santestevan NA, Zvoboda DA, Prichulla J, Pereira RI, Wachholz GR, Cardoso LA, Moura TM, Medeiros AW, Amorin DB, Tavares M, d'Azevedo PA, Franco AC, Frazzon J, Frazzon APG. 2015. Antimicrobial resistance and virulence factor gene profiles of *Enterococcus* spp. isolates from wild *Arctocephalus australis* (South American fur seal) and *Arctocephalus tropicalis* (Subantarctic fur seal). *World J Microbiol Biotechnol* 31(12): 1935-46. doi: 10.1007/s11274-015-1938-7
- Schreiber EA, Burger J. 2001. Biology of Marine Birds. *Waterbirds: Int J Waterbird Biol.* 25(2):259-261.
- Scott KP, Gratz SW, Sheridan PO, Flint HJ, Duncan SH. 2013. The influence of diet on the microbiota. *Pharmacological Res.* 69(1):52-60.
- Shokralla S, Spall JL, Gibson JF, Hajibabaei M. 2012. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Mol Ecol.* 21: 1794-1805.
- Sielfeld WK. 1999. Estado del conocimiento sobre conservación y preservación de *Otaria flavescens* (Shaw, 1800) y *Arctocephalus australis* (Zimmermann, 1783) en las costas de Chile. *Estud Oceanol.* 18:81-96.
- Silva KG. 2014. Projeto Mamíferos Marinhos no Litoral do Rio Grande do Sul. Rio Grande-RS. Nema.
- Singh B, Bhat TK, Kurade NP, Sharma OP. 2008. Metagenomics in animal gastrointestinal ecosystem: a microbiological and biotechnological perspective. *Indian J. Microbiol.* 48:216-227.
- Smith SC, Chalker A, Dewar ML, Arnould JP. 2013. Age-related differences revealed in Australian fur seal *Arctocephalus pusillus doriferus* gut microbiota. *FEMS Microbiol Ecol.* 86:246-55.
- Stecher B, Hardt WD. 2008. The role of microbiota in infections disease. *Trends Microbiol.* 16(3): 107-114.
- USEPA. 1986. Microbial (Pathogen)/Recreational Water Quality Criteria. U.S. Environmental Protection Agency: Office of Water
- USEPA. 1999. Environmental Regulations and Technology: Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge. U.S. Environmental Protection Agency: Office of Water

- Vanstreels RET, Adornes AC, Ruoppolo V, Canabarro PL, Silva-Filho RP, Catão-Dias JL. 2011. Gender Determination From Morphometrics In Migrating Magellanic Penguins *Spheniscus Magellanicus*. *Mar Ornithol*. 39:215–220.
- Vaz-Ferreira R, Leon AP. 1987. South American fur seal, *Arctocephalus australis*, in Uruguay. In Croxall JP, Gentry RL (ed) Status, biology and ecology of fur seals. National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA): Technical Report. National Marine Fisheries Service (NMFS), v.51. Montevideo, Uruguay, pp 29-32.
- Walter J, Ley R. 2011. The Human Gut Microbiome: Ecology and Recent Evolutionary Changes. *Annu. Rev. Microbiol.* 65:411–429.
- Wright GD. 2007. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Reviews | Microbiology.* 5: 175-186.
- Yeoman CJ, Chia N, Yildirim S, Miller MEB, Kent A, Stumpf R, Leigh SR, Nelson KE, White BA, Wilson BA. 2011. Towards an evolutionary model of animal-associated microbiomes. *Entropy.* 13:570–594.
- Zoetendal EG, Cheng B, Koike S, Mackie RI. 2004. Molecular microbial ecology of the gastrointestinal tract: from phylogeny to function. *Curr Issues Intest Microbiol.* 5:31–48.

8. Apêndices

Artigos publicados durante o doutorado como co-autora

World J Microbiol Biotechnol. 2015 Dec;31(12):1935-46. doi: 10.1007/s11274-015-1938-7. Epub 2015 Sep 7.

Antimicrobial resistance and virulence factor gene profiles of *Enterococcus* spp. isolates from wild *Arctocephalus australis* (South American fur seal) and *Arctocephalus tropicalis* (Subantarctic fur seal).

Santestevan NA¹, de Angelis Zvoboda D¹, Prichula J², Pereira RI², Wachholz GR², Cardoso LA¹, de Moura TM², Medeiros AW¹, de Amorin DB³, Tavares M³, d'Azevedo PA², Franco AC¹, Frazzon J⁴, Frazzon AP⁵.

⊕ Author information

Abstract

Enterococci are natural inhabitants of the gastrointestinal tracts in humans and animals. Epidemiological data suggest that enterococci are important reservoirs of antimicrobial resistant genes that may be transmitted from other bacterial species. The aim of this study was to investigate the species composition, antimicrobial resistance and virulence genes in enterococci recovered from fecal samples of wild *Arctocephalus australis* and *A. tropicalis* found dead along the South Coast of Brazil. From a total of 43 wild fur seals, eleven were selected for this study. Phenotypic and genotypic characterizations were used to classify *Enterococcus* species. Strains were tested for susceptibility to 10 antibiotics, presence of *ace*, *gelE*, *asa*, *cylA*, *tet(L)*, *tet(M)* and *erm(B)* genes by PCR, and genetic variability using RAPD-PCR. Among the 50 enterococci isolated, 40% were *Enterococcus faecalis*, 40% *E. hirae*, 12% *E. casseliflavus* and 8 % other enterococcal species. Resistance profiles were observed to erythromycin, nitrofurantoin, tetracycline, norfloxacin and ciprofloxacin. The prevalence of virulence genes was *ace* (68%), *gelE* (54%), *asa* (22%) and *cylA* (4%). In erythromycin- and tetracycline strains, *erm(B)* and *tet(M)* were detected, respectively. The RAPD-PCR demonstrated a close phylogenetic relationship between the enterococci isolated from *A. australis* and *A. tropicalis*. In conclusion, different enterococcus species showing antimicrobial resistance and virulence determinates were isolated from fecal samples of fur seals. Antibiotic resistant strains in these animals could be related within food chain and aquatic pollutants or linked to environmental resistome, and demonstrates the potential importance of these animals as reservoirs and disseminators of such determinants in marine environmental.

KEYWORDS: Antimicrobial susceptibility; Enterococci species; Virulence genes; Wild fur seals

PMID: 26347323 [PubMed - in process]

Mar Pollut Bull. 2016 Mar 4. pii: S0025-326X(16)30123-0. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.02.071. [Epub ahead of print]

Resistance to antimicrobial agents among enterococci isolated from fecal samples of wild marine species in the southern coast of Brazil.

Prichula J¹, Pereira RI¹, Wachholz GR², Cardoso LA³, Tofo NC², Santestevan NA³, Medeiros AW³, Tavares M⁴, Frazzon J⁵, d'Azevedo PA², Frazzon AP⁶.

⊕ Author information

Abstract

The purpose of this study was to evaluate species distribution, antimicrobial resistance profiles, and presence of resistance genes in enterococci isolated from fecal samples of wild marine species, including seabirds (n=12), sea turtles (n=8), and mammals (n=3) found alive or dead in southern coast of Brazil. Enterococci were classified based on phenotypic and genotypic characteristics, tested for antibiotic susceptibility, and the presence of *tet(S)*, *tet(M)*, *tet(L)*, *mrsC*, and *erm(B)* genes by PCR. *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* were the most common species. Single (37.09%), double (25.80%), and multiple (16.12%) antibiotic resistance patterns were observed. Resistance to rifampicin occurred most frequently. The *mrsC*, *tet(M)*, and/or *tet(L)* genes were detected in 60.15%, 73.07%, and 23.07% of the resistant strains, respectively. In conclusion, the presence of antibiotic resistant strains in these species could be related to food web interactions and aquatic pollutants or linked to environmental resistome.

Copyright © 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

KEYWORDS: Enterococci resistant; Resistance genes; Wild marine species

PMID: 26952995 [PubMed - as supplied by publisher]