

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**  
**BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**CAMILA COUTINHO DOS SANTOS**

**IDENTIFICAÇÃO E SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE**  
**BACTÉRIAS ISOLADAS DA SUPERFÍCIE CUTÂNEA DE TARTARUGAS**  
**MARINHAS DO LITORAL DO RS.**

**Porto Alegre**

**2018**

**CAMILA COUTINHO DOS SANTOS**

**IDENTIFICAÇÃO E SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE  
BACTÉRIAS ISOLADAS DA SUPERFÍCIE CUTÂNEA DE TARTARUGAS  
MARINHAS DO LITORAL DO RS.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Comissão de Graduação do curso de Ciências  
Biológicas requisito parcial para obtenção do título  
de Bacharel em Ciências Biológicas na  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof. Dra. Ana Paula Guedes Frazzon

Co-orientadora: Msc. Letícia da Fontoura Xavier  
Costa

**Porto Alegre**

**2018**

**Identificação e sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas da superfície cutânea de tartarugas marinhas do litoral norte do RS.**

Camila Coutinho dos Santos<sup>1\*</sup>, Letícia Da Fontoura Xavier Costa<sup>1</sup>, Maurício Tavares<sup>2</sup> e

Ana Paula Guedes Frazzon<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia Ambiental e de Alimentos, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmento Leite, nº 500 – 2º andar, sala 222 C. CEP: 90050-170. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

2. Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos (Ceclimar), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

\*Contato do autor: Camila Coutinho dos Santos – [camilacoutinho4@hotmail.com](mailto:camilacoutinho4@hotmail.com)

Manuscrito formatado conforme os padrões da Revista Brasileira de Biociências.

As tabelas essenciais seguem ao longo do texto para melhor compreensão.

## **Identificação e sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas da superfície cutânea de tartarugas marinhas do litoral norte do RS.**

**RESUMO:** Devido à dificuldade em se obter amostras, poucos são os estudos que avaliam bactérias presentes nos animais selvagens. As tartarugas marinhas são animais marinhos migratórios que devido às ações antropogênicas estão na lista de animais em extinção. O resíduo das cidades liberado no ambiente, dispersa microrganismos que competem com espécies nativas, além de fármacos, metais pesados e outros poluentes que também são fatores interferentes para a vida marinha. Uma vez que as tartarugas marinhas podem ser utilizadas como bioindicadores da qualidade dos habitats marinhos, o objetivo do presente estudo foi avaliar quais bactérias estariam presentes na superfície cutânea de diferentes espécies de tartarugas marinhas encontradas no litoral norte do Rio Grande do Sul. A partir de uma bacterioteca, foram selecionadas 114 bactérias previamente isoladas de superfícies corporal, cloacal e ocular das tartarugas marinhas das espécies: *Chelonia mydas*, *Caretta caretta* e *Eretmochelys imbricata*. As bactérias foram reativadas e submetidas à identificação por MALDI-TOF e sequenciamento do gene *16S rRNA*. Além disso, os isolados foram submetidos ao teste de disco de difusão para identificar o perfil de resistência aos antimicrobianos. 69 obtiveram sucesso na reativação. Foram identificados 34 isolados dos gêneros *Enterococcus*, *Bacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Brachybacterium* e *Exiguobacterium*. O teste de susceptibilidade a antimicrobianos verificou perfil de resistência em 24 dos 30 isolados testados. Concluiu-se que o despejo de dejetos e o alto índice de poluição das praias podem afetar a microbiota de animais marinhos e ocasionar um aumento da incidência de patógenos resistentes a antimicrobianos.

**Palavras-chave:** Microbiota; Quelônios; Perfil de Resistência.

**Identification and sensibility to antimicrobials of isolated bacteria from the skin surface of sea turtles on the North coast of RS.**

**ABSTRACT:** Due to the difficulty in obtaining samples, few studies evaluating bacteria present in wild animals. Sea turtles are migratory marine animals that due to anthropogenic actions are on the list of endangered animals. The waste from cities released into the environment, disperses micro-organisms that compete with native species, as well as drugs, heavy metals and other pollutants that are also interfering factors for marine life. Since sea turtles can be used as bioindicators of marine habitat quality, the objective of the present study was to evaluate which bacteria would be present on the cutaneous surface of different sea turtle species found on the northern coast of Rio Grande do Sul. From bacteriotheca, 114 bacteria previously isolated from body, cloacal and ocular surfaces of the marine turtles of the species *Chelonia mydas*, *Caretta caretta* e *Eretmochelys imbricata*, were selected. Bacteria were reactivated and subjected to MALDI-TOF identification and sequencing of the 16S *rRNA* gene. In addition, the isolates were submitted to the diffusion disc test to identify the antimicrobial resistance profile. 69 isolates were successful at reactivation. 34 isolates of the genera *Enterococcus*, *Bacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Brachy bacterium* and *Exiguobacterium* were identified. The antimicrobial susceptibility test verified resistance profile in 24 of the 30 isolates tested. It was concluded that the discharge of manure and the high pollution index of the beaches can affect the microbiota of marine animals and cause an increase in the incidence of antimicrobial resistant pathogens.

**Keywords:** Microbiota; Chelonians; Profile of Resistance.

## 1. INTRODUÇÃO

As tartarugas marinhas são animais migratórios que possuem como rota a costa brasileira. Atualmente são conhecidas apenas oito espécies desta linhagem reptiliana no mundo e, dentre estas, cinco habitam e se reproduzem no Brasil. Estes animais são subdivididos em duas famílias, sendo a família Dermochelyidae representada pela espécie *Dermochelys coriacea* (Linnaeus, 1766), e a família Cheloniidae representada pelas espécies *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758), *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758), *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus, 1766) e *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829) (Baptistotte, 1992).

Microrganismos aquáticos são a principal fonte de oxigênio e carboidratos no ambiente aquático, e, além disso, são responsáveis também pela base da cadeia trófica dos rios, lagos e oceanos. Pouco se conhece sobre a microbiologia marinha, em grande parte pela dificuldade de coletar e/ou cultivar os microrganismos. Estima-se que um terço de toda a vida do planeta consista em microrganismos presentes no fundo do mar (Tortora *et al.*, 2012). Estudos de Almeida (2009) demonstraram que os gêneros mais comuns de bactérias marinhas encontradas nas zonas fóticas do oceano são *Vibrio*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Yangia*, *Aeromonas* e *Alteromonas*.

Os microrganismos são de grande importância para manutenção do equilíbrio biológico dos organismos vivos e dos compostos presentes no ambiente. Cada animal possui uma microbiota específica, a qual auxilia na ingestão de nutrientes e síntese de vitaminas. Os microrganismos, também possuem papel fundamental na manutenção dos ciclos biológicos, como o do nitrogênio e do carbono, atuando na decomposição dos materiais que retornam ao ambiente como nutrientes a serem utilizados (Tortora *et al.*, 2012). Bactérias, fungos e leveduras possuem papel fundamental em usos biotecnológicos de valor comercial, como por exemplo, a produção de medicamentos,

atuação como controles biológicos e também na biorremediação ambiental (Melo & Azevedo, 2008).

Os oceanos sofrem grande impacto causado pela presença do homem nesses ambientes. Muitas vezes pode ocorrer uma interferência no microbioma local, causando a competição entre espécies invasoras e espécies nativas. As espécies nativas podem ser eliminadas desse ambiente, resultando em uma perda da diversidade microbiana. A presença de espécies invasoras pode sinalizar o grau de impacto de um ecossistema. Outra consequência relacionada ao aumento de espécies invasoras em regiões costeiras seria o desenvolvimento ou, até mesmo, a potencialização da patogenicidade destas populações exóticas nestes ambientes (Melo & Azevedo, 2008).

Quando comparada à microbiota de animais aquáticos, a microbiota epidérmica de animais terrestres é mais estudada devido à alta taxa de doenças associadas a estes organismos. Os principais gêneros de patógenos epidérmicos são *Staphylococcus* e *Streptococcus*. Estes grupos bacterianos possuem facilidade na adaptação à pele de humanos e animais devido à presença de enzimas invasivas e toxinas, bem como fatores de virulência que podem auxiliar na aderência aos tecidos (Tortora *et al.*, 2012).

Doenças epidérmicas infecciosas causadas por bactérias possuem baixa incidência em tartarugas marinhas encontradas no ambiente natural. Porém, a expansão das atividades antrópicas nas regiões oceânicas é um fator de risco, uma vez que a poluição inserida neste ambiente pode interferir diretamente nos indivíduos aquáticos, ocasionando episódios de estresse e imunossupressão. Alguns dos principais patógenos encontrados em animais debilitados que buscam a costa como refúgio são: *Aeromonas*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Vibrio*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Arizona* e *Flavobacterium* (Cubas *et al.*, 2006).

A antropização interfere também na disseminação de antibióticos e bactérias resistentes no meio aquático, sendo esta uma das vias pela qual genes de resistência podem ser introduzidos no ecossistema, alterando a microbiota ambiental. A resistência aos antibióticos tem sido observada em grande diversidade de microrganismos e em diversos ambientes aquáticos (Baqueiro, 2008). Martinez (2003) verificou que mais de 90 % dos isolados bacterianos amostrados da água do mar eram resistentes a pelo menos um tipo de antibiótico e, deste percentual, em torno de 20 % possuíam perfil de resistência a pelo menos outros cinco antimicrobianos.

Todas as espécies de tartarugas marinhas estão presentes na Lista Vermelha de espécies ameaçadas de extinção (IUCN, 2018), o que torna a identificação dos patógenos destes animais cada vez mais necessária para auxiliar na conservação e manutenção destas linhagens. O presente estudo teve como objetivo a identificação de bactérias presentes na superfície corporal, ocular e cloacal de diferentes espécies de tartarugas marinhas encontradas no litoral norte do Rio Grande do Sul.

## **2. METODOLOGIA**

### ***Material de Estudo***

O total de 114 amostras foram utilizadas neste estudo. Os isolados analisados pertencem ao Banco de Amostras do Laboratório 222-C de Microbiologia Ambiental e Alimentar, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As coletas das amostras foram realizadas pelo Centro de Reabilitação de Animais Marinhos (CERAM) no litoral norte do Rio Grande do Sul, no momento em que os animais foram encontrados. As bactérias foram isoladas das superfícies corporais (SC) e oculares (OE) de tartarugas marinhas das espécies: *Chelonia mydas*, *Caretta*

*caretta* e *Eretmochelys imbricata* (Tabela 1) (Mesquita, 2014). A denominação CM é referente a esfregaços da superfície cloacal da espécie *C. mydas*.

**Tabela 1** - Dados de cada indivíduo coletados pelo Setor de Reabilitação.

Código	Nome popular	Espécie	Motivo da doação	Faixa etária
3064	Tartaruga-cabeçuda	<i>Caretta caretta</i>	Mutilada por rede	Adulto
3082	Tartaruga-de-pente	<i>Eretmochelys imbricata</i>	Debilitada	Juvenil
L222C	SI	SI	SI	SI
3133	Tartaruga-verde	<i>Chelonia mydas</i>	Nadadeiras cortadas	Juvenil
3171	Tartaruga-de-pente	<i>Eretmochelys imbricata</i>	Debilitada	Indeter.
CM	Tartaruga-verde	<i>Chelonia mydas</i>	SI	SI

SI: sem informação

Os microrganismos foram previamente isolados e preservados em solução de 10 % (p/v) de leite desnatado Molico® (Nestlé) acrescido de 10 % (v/v) de glicerol e congeladas a -20 °C, conforme descrito por Mesquita (2014). As bactérias foram inoculadas em meio de cultura *Brain Heart Infusion Agar (BHIA)* enriquecido com água marinha esterilizada, e posteriormente foram incubadas a 37 °C durante 24 horas. Após este período foi realizada a verificação do crescimento bacteriano, a análise fenotípica de morfologia e pigmentação das colônias, e foram aplicados os testes de coloração de Gram e catalase.

### **Identificação Bacteriana**

As amostras foram submetidas à espectrometria de massas pelo equipamento MALDI-TOF, que consiste em utilizar proteínas específicas para a identificação de bactérias. Foram realizados repicagens em meio *BHIA*, com incubação a 37 °C durante 24 horas, para a renovação das colônias bacterianas. Posteriormente, uma parcela de cada cultura foi, individualmente, adicionada a 300 µL de água Milli-Q estéril e em

seguida foram adicionados 900 µL de etanol absoluto. A solução foi homogeneizada em equipamento vortex e armazenada a 4 °C por até uma semana para posterior identificação.

Os isolados bacterianos que não foram identificados pela técnica do MALDI-TOF foram submetidos ao sequenciamento utilizando o gene *16S rRNA*. Foi realizada a extração do DNA por lise química conforme descrito por Donato *et al.* (2007). O procedimento de extração consiste na retirada de uma alíquota da amostra preservada, a qual foi semeada por esgotamento em placas contendo *BHIA*, seguido de incubação em estufa bacteriológica durante 24 horas a 37 °C. Após a incubação, foi transferida uma alçada deste crescimento para 2 mL de caldo BHI, que foi incubado durante 24 horas a 37 °C. Logo após, 1 mL deste crescimento foi transferido para um microtubo de 1,5 mL, o qual foi submetido a centrifugação a 13.000 rpm durante 5 minutos.

O sobrenadante foi descartado, e foram adicionados 40 µL de solução de lise [5 mL de NaOH 1M; 2,5 mL de SDS 10% (Dodecil Sulfato de Sódio)] para ressuspensão do precipitado, o qual foi homogeneizado em equipamento vortex. Os isolados foram mantidos em equipamento de banho seco durante 15 minutos a 100 °C, e logo após esse período, foram adicionados 460 µL de tampão TE 1X. Foi realizada centrifugação a 13.000 rpm durante 5 minutos e o sobrenadante contendo o DNA foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL. Esse DNA foi armazenado sob refrigeração a -20 °C até o preparo dos isolados para a reação em cadeia da polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*).

Esta etapa é responsável pela amplificação parcial do gene *16S rRNA* presente no DNA bacteriano que foi sequenciado. A reação da PCR foi realizada em volume total de 25 µL, contendo 100 ng de DNA, 1x de tampão de reação da Taq (4G®), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (4G®), 200

$\mu\text{M}$  de dNTPs (Ludwig Biotecnologia®), 1U de *Taq* DNA polimerase (4G®) e água Milli-Q estéril para completar o volume da reação.

A análise foi realizada a partir do gene *16S rRNA*, sendo este gene responsável pela identificação de uma região conservada no genoma bacteriano. A PCR foi realizada nas condições de 5 minutos a 94 °C, seguida por 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 58 °C e 1 minuto a 72 °C, com extensão final de 10 minutos a 72 °C. O DNA utilizado como controle positivo foi de *E. faecalis* ATCC 29212. Posteriormente, o material foi analisado em gel de agarose 1,5 % para verificação da efetividade da reação.

Para o sequenciamento foram preparados microtubos contendo 10 ng dos amplicons, 3,2 pmol de oligonucleotídeo iniciador *Reverse* (Invitrogen®) e água Milli-Q estéril para completar o volume total de 7  $\mu\text{L}$ . O material foi analisado pelo Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Ciências Básicas da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), com a utilização do equipamento ABI 3130 da *Applied Biosystems*, com *big dye terminator* versão 3.1 e polímero pop7.

As amostras sequenciadas foram identificadas com o auxílio do programa *Chromas Technelysium Pty Ltd* (versão 2.6.4) e utilização do banco de dados de DNA *NCBI* (*National Center for Biotechnology Information*).

Os isolados identificados como *Bacillus* sp. foram submetidos a técnica de Schaeffer-Fulton, ou também conhecida como coloração de verde malaquita. Esta técnica é utilizada para visualização dos endósporos característicos do gênero. Foram realizados esfregaços dos isolados em lâminas de microscopia e então adicionado o corante verde malaquita. As lâminas foram expostas ao calor por alguns minutos, para fixação do corante na parede do endósporo, e posteriormente a lâmina foi lavada com água destilada. O corante safranina foi adicionado para que a visualização das células

vegetativas fosse possível. A análise foi realizada em microscópio óptico em lente objetiva de imersão (100x).

### ***Suscetibilidade Antimicrobiana***

A determinação do perfil de suscetibilidade antimicrobiana foi verificada através do método de disco de difusão, de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*. Para a realização do antibiograma, foram utilizados antimicrobianos específicos para os microrganismos com base no *CLSI* (2017) para os gêneros *Enterococcus* e *Staphylococcus*. Para os gêneros *Listeria* e *Bacillus* os dados utilizados foram retirados de Oliveira (2016) e de Ferreira (2017), respectivamente. As listas de antibióticos utilizados estão descritos na tabela 2.

**Tabela 2:** Antibióticos e concentrações utilizadas por grupo de bactérias estudado.

<b>Gênero</b>	<b>Antibióticos</b>
<b><i>Bacillus</i></b>	Ciprofloxacina CIP - (5 mcg)
	Gentamicina GEN - (10 mcg)
	Rifampicina RIF - (30 mcg)
	Tetraciclina TET - (30 mcg)
	Vancomicina VAN – (30 mcg)
<b><i>Enterococcus</i></b>	Ampicilina AMP - (10 mcg)
	Ciprofloxacina CIP - (5 mcg)
	Cloranfenicol CLO - (30 mcg)
	Eritromicina ERI - (15 mcg)
	Estreptomicina EST - (300 mcg)
	Gentamicina GEN - (120 mcg)
	Linezolida LNZ – (30 mcg)
	Nitrofurantoina NIT - (300 mcg)
	Norfloxacina NOR - (10 mcg)
	Rifampicina RIF - (5 mcg)
	Tetraciclina TET - (30 mcg)
	Vancomicina VAN – (30 mcg)
<b><i>Listeria</i></b>	Ampicilina AMP - (10 mcg)
	Ciprofloxacina CIP - (5 mcg)
	Cloranfenicol CLO - (30 mcg)
	Eritromicina ERI - (15 mcg)
	Gentamicina GEN - (10 mcg)
	Penicilina G PEN - (10 U)

---

	Rifampicina RIF - (5 mcg)
	Tetraciclina TET - (30 mcg)

---

<i>Staphylococcus</i>	Ciprofloxacina CIP - (5 mcg)
	Cloranfenicol CLO - (30 mcg)
	Eritromicina ERI - (15 mcg)
	Gentamicina GEN - (10 mcg)
	Nitrofurantoina NIT - (300 mcg)
	Norfloxacina NOR - (10 mcg)
	Penicilina G PEN - (10 U)
	Rifampicina RIF - (5 mcg)
	Tetraciclina TET - (30 mcg)

---

Os isolados foram repicados em *BHIA* por método de esgotamento a partir da preservação em leite desnatado (Molico, Nestlé®) e foram incubados em estufa bacteriológica durante 24 horas a 37 °C. Posteriormente, colônias puras foram selecionadas e diluídas em 5 mL de solução salina 0,85 % até atingir a turvação equivalente à solução padrão 0,5 da escala de McFarland. Em seguida, um suabe estéril foi embebido na solução bacteriana padronizada e foram realizadas estrias em 3 direções em placas de meio de cultura contendo Ágar Müller-Hinton. Os discos contendo os antimicrobianos foram colocados sobre a superfície dos meios e as placas foram incubadas durante 24 horas a 37 °C para posterior medição e interpretação do diâmetro dos halos de inibição, em milímetros.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### *Identificação Bacteriana*

Do total de 114 isolados, 69 microrganismos (61 %) foram reativados conforme o método de enriquecimento utilizado. Foram reativados 31 isolados de SC (44 %), 25 de OE (36 %) e 14 cloacais (20 %). Saeki e colaboradores (2015) verificaram a

viabilidade de culturas criopreservadas com leite desnatado, e em períodos relativamente curtos as culturas não sofreram alteração. Oplustil *et al.* (2010) recomendaram que a armazenagem de bactérias Gram-positivas sejam em glicerol ou leite desnatado a -20 °C entre 1 a 3 anos, e Gram-negativas em sacarose e/ou lactose entre 1 a 2 anos. A viabilidade das bactérias utilizadas no presente estudo pode ter sido afetada pelo tempo de armazenamento das culturas criopreservadas, as quais estavam a quatro anos em armazenamento contínuo.

A análise pelo equipamento MALDI-TOF identificou 30 amostras (43 %) em nível de gênero, sendo elas, 16 (53 %) *Enterococcus* sp; 8 (27 %) *Bacillus* sp.; 5 (17 %) *Listeria* sp. e em um único isolado (3 %) *Staphylococcus* sp. (Tabela 3).

Este equipamento possui um banco de dados composto em sua maioria por amostras clínicas, sendo esta uma limitação da utilização deste equipamento em amostras ambientais. Os microrganismos que não foram identificados receberam a titulação de “amostras não identificadas”.

Os 39 isolados que não foram identificados por MALDI-TOF, foram submetidos a reação de PCR para o gene *16S rRNA*. Destes, 11 (16 %) não apresentaram fragmentos de DNA esperado para o gene *16S rRNA*. A não amplificação pode estar relacionada ao método de purificação de DNA, que deixa algumas vezes restos celulares que podem interferir na reação de PCR. Dos 28 isolados que amplificaram para o gene *16S rRNA*, até o momento foram enviadas quatro cepas para o sequenciamento, sendo estas identificadas com elevado grau de similaridade com o gene *16S rRNA* de *Bacillus* sp. (n=1), *Brachybacterium* sp. (n=1) e *Exiguobacterium* sp. (n=2), como pode ser observado na Tabela 4. As análises dos outros 24 isolados serão realizadas futuramente.

**Tabela 3:** Isolados identificados pelo equipamento MALDI-TOF.

<b>Identificação do Isolado</b>	<b>Gênero</b>
L222C OE 2	<i>Enterococcus</i> spp.
L222C OE 5	<i>Bacillus</i> spp.
L222C OE 7	<i>Enterococcus</i> spp.
L222C OE 9	<i>Bacillus</i> spp.
L222C OE 11	<i>Bacillus</i> spp.
L222C OE 12	<i>Bacillus</i> spp.
L222C OE 14	<i>Bacillus</i> spp.
L222C OE 15	<i>Bacillus</i> spp.
L222C OE 17	<i>Bacillus</i> spp.
L222C OE 18	<i>Bacillus</i> spp.
3064 OE 6	<i>Listeria</i> spp.
3064 SC 2	<i>Listeria</i> spp.
3064 SC 3	<i>Listeria</i> spp.
3064 SC 4	<i>Listeria</i> spp.
3064 SC 6	<i>Listeria</i> spp.
3082 SC 2	<i>Staphylococcus</i> spp.
CM A	<i>Enterococcus</i> spp.
CM B	<i>Enterococcus</i> spp.
CM C	<i>Enterococcus</i> spp.
CM D	<i>Enterococcus</i> spp.
CM E	<i>Enterococcus</i> spp.
CM F	<i>Enterococcus</i> spp.
CM G	<i>Enterococcus</i> spp.
CM H	<i>Enterococcus</i> spp.
CM I	<i>Enterococcus</i> spp.
CM J	<i>Enterococcus</i> spp.
CM K	<i>Enterococcus</i> spp.
CM L	<i>Enterococcus</i> spp.
CM M	<i>Enterococcus</i> spp.
CM N	<i>Enterococcus</i> spp.

**Tabela 4:** Isolados identificados pelo sequenciamento do gene *16S rRNA*.

<b>Identificação do Isolado</b>	<b>Gênero</b>
L222C OE 10	<i>Bacillus</i> spp.
3133 OE 5	<i>Brachybacterium</i> spp.
3171 SC 6	<i>Exiguobacterium</i> spp.
3171 SC 7	<i>Exiguobacterium</i> spp.

As regiões que apresentaram maior diversidade foram à superfície ocular e a superfície corporal, ambas com três gêneros distintos. A superfície ocular apresentou três gêneros distintos, sendo eles: *Bacillus*, *Brachy bacterium* e *Enterococcus*. Na superfície corporal das tartarugas foram identificados os seguintes gêneros: *Exiguobacterium*, *Listeria* e *Staphylococcus*. O único gênero encontrado em mais de uma zona corporal foi o gênero *Enterococcus*. Os outros isolados, até o presente momento, foram exclusivos de cada região corporal.

Os enterococos são bactérias em forma de cocos, Gram-positivas, comuns na microbiota intestinal de animais, tais como mamíferos, répteis e aves. Este grupo é utilizado como indicador de contaminação fecal nos ambientes (Torres, 2018). Ao total, 16 isolados foram identificados como *Enterococcus* spp., sendo 14 (87,5 %) isolados da região cloacal. Trabalhos anteriores também relataram a presença destes microrganismos no trato intestinal de animais, confirmando que são microrganismos naturais do sistema digestivo (Poeta *et al.*, 2005; Santestevan, 2014; Prichula, 2015; Pereira, 2016; Costa, 2018; Grassotti *et al.*, 2018). Nos estudos de Pereira (2016) foram identificados *Enterococcus* spp. em amostras cloacais de *Chelonia mydas* e *Eretmochelys imbricata*, o que confirma os dados obtidos neste trabalho. Medeiros (2017) avaliou animais marinhos quanto à presença de enterococos, e foram identificados seis espécies de *Enterococcus* em tartarugas-verdes. Não foi encontrado estudo evidenciando a microbiota da superfície corporal de répteis que citasse enterococos.

O gênero *Bacillus* é um bastonete Gram-positivo aeróbio e com tamanho variável. Podem ou não apresentar cílios que auxiliam na mobilidade das bactérias. Assim como o gênero *Clostridium*, os *Bacillus* possuem a capacidade de esporulação (Tortora *et al.*, 2017). Estas bactérias podem ser encontradas nos mais variados

ambientes. Segundo Priest (1977), a facilidade de adaptação deste grupo ocorre pela grande variedade de enzimas utilizadas para a degradação de substratos. A presença de integrantes marinhos deste grupo já foi divulgada anteriormente em água marinha e associada à microbiota de esponjas e corais (Ivanova *et al.*, 2000). Foi comprovado pelos estudos de Abaroa *et al.* (2008) que este gênero é comumente encontrado em águas quentes, juntamente com os gêneros *Micrococcus* e *Corynebacterium*. Diversos estudos evidenciaram a presença de *Bacillus* em chelonios. Benites e colaboradores (2013) encontraram 43 % dos isolados de coletas cloacais oriundos da espécie Jabutis-Pitanga com o gênero *Bacillus*, sendo o terceiro mais abundante dentre os demais gêneros encontrados. A espécie *C. mydas* também apresentou este gênero em amostras cloacais nos estudos de Aguirre *et al.* (1994). A presença dos *Bacillus* spp. em superfícies oculares de répteis foi registrada nos estudos de Santos (2011). Do total de 25 isolados de Jabutis-Pitanga, oito (32 %) foram identificados como pertencentes ao gênero *Bacillus*. O mesmo estudo identificou que a presença deste grupo de bactéria é comum em superfícies oculares de outros animais, sendo o terceiro mais prevalente (14,5 %) após os gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*. A presença de *Bacillus* spp. no presente estudo superior quando comparado aos dados obtidos na literatura, com 27 % do total de amostras identificadas.

*Listeria* spp. é um grupo de microrganismos composto por espécies com forma de bacilos Gram-positivos, anaeróbias facultativos e flagelares (Singleton, 1999). Este gênero é comumente estudado na área da microbiologia de alimentos, com prevalência de estudos relacionados à espécie *L. monocytogenes*, a qual é considerada como patógena oportunista para os mamíferos. Em isolados de águas superficiais, esgotos e fezes de animais já foram encontradas bactérias do gênero *Listeria*, comprovando a ampla distribuição deste gênero (Catão & Ceballos, 2001). Em 2005, El-Shenawy e El-

Shenawy, obtiveram isolados deste gênero a partir de amostras de água marinha. Outros estudos também verificaram a presença deste grupo em fezes de mamíferos e aves selvagens (Yoshida *et al.*, 2000). Embora sejam consideradas patógenos oportunistas para os répteis (McArthur *et al.*, 2004), pouco se conhece sobre a presença deste gênero na microbiota de tartarugas. O trabalho de Nowakiewicz *et al.* (2015) identificou um grupo de listérias em amostras cloacais de cágados-de-carapaça-estriada, o que torna, nosso estudo um dos primeiros a relatar a presença de *Listeria* spp. na superfície corporal de tartarugas marinhas.

Outro grupo encontrado em águas marinhas é o gênero *Exiguobacterium*, composto por microrganismos Gram-positivos e anaeróbios facultativos, os quais possuem diversidade morfológica que se altera conforme as condições do ambiente onde se encontra (Vishnivetskaya *et al.*, 2009). Chen e colaboradores (2017) citam a vasta gama de ambientes onde estes microrganismos já foram detectados. Ambientes frios e quentes servem de habitats a estas bactérias, pois são capazes de suportar faixas de temperatura entre -12°C e 55°C, bem como amplas faixas de pH e salinidade. Além disso, podem ser encontrados em solos tropicais e temperados, e até mesmo em solos congelados da região ártica, também conhecidos como *permafrost*. Nos estudos de Tena *et al.* (2014) houveram relatos da patogenicidade deste grupo de microrganismos em superfície epitelial de humanos, mas não há na literatura sobre o potencial de infecção em outros seres vivos.

O gênero *Brachybacterium* foi identificado e descrito por Collins e colaboradores em 1988, os quais foram isolados primariamente de aves. Estes microrganismos são Gram-positivos aeróbios, e atualmente já foram identificadas 12 espécies desse gênero (Park *et al.*, 2011). Conforme Takeuchi e colaboradores (1995), as bactérias do gênero *Brachybacterium* são catalase positiva, capazes de hidrolisar a

esculina e de crescerem em elevadas concentrações de sal [15% NaCl] (Takeuchi *et al.*, 1995). Estes dados foram comprovados no presente estudo, uma vez que foram isolados de animais marinhos, que tem como seu habitat zonas costeiras e o oceano, com águas em salinidade perto a 3,5 %. Zhao e colaboradores (2016) encontraram bactérias desse mesmo gênero em sedimentos no fundo do mar, indicando assim que este gênero é capaz de se manter viável em condições variadas de temperatura e salinidade. Estudos isolaram estes microrganismos em amostras fecais de Pinguins-de-Adélia e foram observados padrões de resistência bacteriana ao antibiótico tetraciclina (Rahman *et al.*, 2015).

Os estafilococos são bactérias Gram-positivas; em forma de cocos com arranjo aglomerado do tipo “cacho de uva”, e são, em maioria, anaeróbios facultativos. Sua distribuição é comum na microbiota de animais em geral, e suas espécies estão entre os patógenos mais comuns dos humanos (Murray *et al.*, 2004). No trabalho de Santoro *et al.* (2006) *Staphylococcus* spp. foram isolados em 73,2 % dos 70 suabes cloacais de *C. mydas* analisados. Estudos de identificação de bactérias presente em lesões da superfície externa de tartarugas Tigres D’agua confirmaram a presença de *Staphylococcus* spp. nas amostras, dentre outros microrganismos (Souza, 2006). Ao contrário do que observado na literatura, o presente estudo identificou apenas um (3 %) isolado de *Staphylococcus* spp. Este fato pode evidenciar a interferência da antropização nos ambientes marinhos e na microbiota dos animais.

Ao total foram identificados seis gêneros distintos. Destes, *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. foram estudados e descritos na literatura como patógenos de tartarugas marinhas (Alfaro *et al.*, 1994; Gornik *et al.*, 2016). O gênero *Listeria* sp. foi classificado como patógeno oportunista nos estudos de McArthur e colaboradores (2004).

### ***Suscetibilidade antimicrobiana***

O teste de sensibilidade ao disco de difusão foi realizado para os 30 isolados que foram identificados pelo MALDI-TOF. De todos os microrganismos analisados para a susceptibilidade antimicrobiana, 24 (80 %), apresentaram perfil de resistência a pelo menos a um tipo de antimicrobiano. Dos oito *Bacillus* spp. que foram testados para os antibióticos ciprofloxacina, gentamicina, rifampicina, tetraciclina e vancomicina, dois (25%) apresentaram resistência a tetraciclina e dois (25 %) a vancomicina (Tabela 5).

**Tabela 5** – Perfil de resistência e suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *Bacillus* spp.

<b>Isolado</b>	<b>Antibióticos*</b>				
	<b>CIP</b>	<b>GEN</b>	<b>RIF</b>	<b>TET</b>	<b>VAN</b>
<b>L222C OE 5</b>	S	S	S	S	S
<b>L222C OE 9</b>	S	S	S	<b>R</b>	<b>R</b>
<b>L222C OE 11</b>	S	S	S	<b>R</b>	S
<b>L222C OE 12</b>	S	S	S	S	<b>R</b>
<b>L222C OE 14</b>	S	S	S	S	S
<b>L222C OE 15</b>	S	S	S	S	S
<b>L222C OE 17</b>	S	S	S	S	S
<b>L222C OE 18</b>	S	S	S	S	S
	0 %	0 %	0 %	25 %	25 %

\* CIP (ciprofloxacina), GEN (gentamicina), RIF (rifampicina), TET (tetraciclina), VAN (vancomicina). S: sensível, I: resistência intermediária, R: resistência.

Este grupo de microrganismos apresentou baixa resistência aos antimicrobianos testados. Apenas 3 (37,5 %), isolados obtiveram perfil de resistência aos antibióticos tetraciclina e vancomicina. Nos estudos bactérias aquáticas presentes no Rio Guaíba

foram isoladas no trabalho de Tomazelli *et al.* (1997) e foi comprovado resistência de microrganismos do gênero *Bacillus* aos antibióticos tetraciclina e vancomicina, tal qual o presente estudo. A resistência a vancomicina também foi descrita no trabalho de Olinda (2010) que isolou o gênero *Bacillus* em catetos criados em cativeiro. As espécies deste grupo são normalmente associadas a probióticos (Silva, 2007), não sendo um patógeno comum dos animais em geral.

Dos isolados do gênero *Enterococcus* sp., 93,75 % apresentaram perfil de resistência a pelo menos um dos antibióticos testados. Os antimicrobianos os quais os isolados apresentaram maior perfil de resistência foram linezolida (62,5 %) e norfloxacina (62,5 %), seguidos por eritromicina (56,25 %) e rifampicina (43,75 %). Apenas nitrofurantoina e estreptomicina foram atuantes em todos os isolados amostrados (Tabela 6).

A resistência de cepas *Enterococcus* sp. isoladas de animais marinhos foi descrita anteriormente em estudos de Prichula (2015), Santestevan *et al.* (2015) e Pereira (2016). Nestes trabalhos citados, a maior parte dos isolados apresentaram perfil de suscetibilidade a todos os antimicrobianos testados, o que não ocorreu no presente estudo. Em Pereira (2016), os fenótipos de resistência foram encontrados para rifampicina (32,9 %), eritromicina (34,2 %) e tetraciclina (0,63 %). Estes resultados podem indicar uma alta taxa de poluição pode afetar o perfil de resistência dos microrganismos presentes neste ambiente, como comprovado no estudo de Arvanitidou *et al.* (2001), onde encontraram 275 (87,3 %) isolados de enterococos resistentes a um ou mais antimicrobianos.

**Tabela 6** – Perfil de resistência e suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *Enterococcus* spp.

Isolado	Antibióticos*											
	AMP	CIP	CLO	ERI	EST	GEN	LNZ	NIT	NOR	RIF	TET	VAN
L222C OE 2	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S
L222C OE 7	S	S	S	R	S	S	I	S	I	S	S	S
CMA	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
CMB	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CM C	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	S
CM D	S	S	S	I	S	S	R	S	I	S	S	I
CME	S	S	I	R	S	S	S	S	I	I	S	S
CM F	S	S	I	S	S	S	R	S	I	I	S	S
CM G	S	S	S	I	S	S	R	S	I	I	S	I
CM H	S	S	I	R	S	S	S	S	I	I	S	S
CM I	S	S	S	S	S	S	I	S	S	I	S	S
CM J	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
CM K	S	I	S	S	S	S	R	S	I	S	S	I
CM L	R	I	S	R	S	S	R	S	R	I	S	S
CM M	S	I	S	S	S	S	R	S	I	I	R	S
CM N	S	S	S	S	S	I	R	S	I	S	S	S
	6,25 %	18,75 %	18,75 %	62,5 %	0 %	6,25 %	56,25 %	0 %	62,5 %	43,75 %	6,25 %	18,75 %

\*AM (ampicilina), CIP (ciprofloxacina), CLO (cloranfenicol), ERI (eritromicina), EST (estreptomicina), GEN (gentamicina), LNZ (linezolida), NIT (nitrofurantoina), RIF (rifampicina), TET (tetraciclina), VAN (vancomicina). S: sensível, I: resistência intermediária, R: resistência.

A resistência a antimicrobianos do gênero *Listeria* foi de 100 % para rifampicina e para tetraciclina (Tabela 7). Trabalhos anteriores já haviam descrito este perfil de resistência, mas não com um índice tão alto.

**Tabela 7** – Perfil de resistência e suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *Listeria* spp.

Isolado	Antibióticos*								
	AMP	CIP	CLO	ERI	GEN	PEN	RIF	TET	VAN
<b>3064 SC 2</b>	S	S	S	<b>R</b>	S	S	<b>R</b>	<b>R</b>	S
<b>3064 SC 3</b>	S	S	S	S	S	S	<b>R</b>	<b>R</b>	S
<b>3064 SC 4</b>	S	S	S	S	S	S	<b>R</b>	<b>R</b>	S
<b>3064 SC 6</b>	S	S	S	S	S	S	<b>R</b>	<b>R</b>	S
<b>3064 SC 8</b>	S	S	S	S	S	S	<b>R</b>	<b>R</b>	S
	0 %	0 %	0 %	20 %	0 %	0 %	100 %	100 %	

\*AMP (ampicilina), \*CIP (ciprofloxacina), \*CLO (cloranfenicol), \*ERI (eritromicina), \*GEN (gentamicina), \*PEN (penicilina), RIF (rifampicina), TET (tetraciclina), \*VAN (vancomicina); S: sensível, I: resistência intermediária, R: resistência.

Conter e colaboradores (2008) encontraram *Listeria monocytogenes* em amostras de alimentos, com capacidade de resistir aos antibióticos previamente citados. No ano de 1993, Charpentier *et al.*, descobriram um novo gene de resistência a tetraciclina – *tet(S)* - encontrado em microrganismos deste gênero. Após um ano, novos estudos de Charpentier e colaboradores (1994) sobre este gene demonstraram a presença do mesmo em microrganismos do gênero *Enterococcus* evidenciando a capacidade dos microrganismos transferirem este gene por conjugação. Nos estudos de Rahimi (2010) foram encontrados sete isolados (12,7 %) com perfil de resistência para eritromicina. O antibiótico eritromicina foi eficiente em 80 % dos isolados deste gênero e apenas um

microrganismo apresentou resistência no presente estudo. Não foram encontradas pesquisas evidenciando a resistência de microrganismos deste grupo aos antibióticos em ambientes aquáticos ou associados a animais selvagens. Por ser um grupo que apresenta patogenicidade a humanos, a maioria dos estudos tem este enfoque.

O único isolado do gênero *Staphylococcus* apresentou perfil de resistência a dois tipos de antimicrobianos, nitrofurantoína e tetraciclina, sendo sensível aos demais antibióticos testados (Tabela 8).

Akinbowale & Barton (2006) realizaram estudos sobre a microbiota de aquicultura e foi verificado resistência destes isolados ao antibiótico tetraciclina. No entanto, não foram encontrados relatos sobre a resistência a nitrofurantoína na literatura deste gênero, como foi encontrado neste trabalho.

**Tabela 8** – Perfil de resistência e suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *Staphylococcus* spp.

Isolado	Antibióticos*										
	CIP	CLO	ERI	GEN	LNZ	NIT	NOR	PEN	RIF	TET	VAN
3082 SC2	S	S	S	S	S	I	S	S	S	I	S
	0%	0%	0%	0%	0%	100	0%	0%	0%	100%	0%
						%					

\*CIP (ciprofloxacina), \*CLO (cloranfenicol), \*ERI (eritromicina), \*GEN (gentamicina), \*LNZ (linezolida), \*NIT (nitrofurantoína), \*NOR (norfloxacina), \*PEN (penicilina), \*RIF (rifampicina), \*TET (tetraciclina), \*VAN (vancomicina); S: sensível, I: resistência intermediária, R: resistência.

Os microrganismos identificados pela técnica de sequenciamento do gene *16S rRNA* serão analisados em relação à suscetibilidade antimicrobiana futuramente. Did, e colaboradores (2009), isolaram o gênero *Brachybacterium* de lagos e verificaram a resistência destes microrganismos aos antimicrobianos: eritromicina, claritromicina, azitromicina, roxitromicina, canamicina, ampicilina e ampicilina+sulbactam. Estudos de

Raichand *et al.* (2012), sobre o gênero *Exiguobacterium* presente em um lago da Índia, descreveram uma nova espécie, *E. aquaticum*. Cepas deste microrganismo apresentaram resistência a rifampicina, nitrofurantóina, bacitromicina e optoquina.

#### **4. CONCLUSÃO**

Com exceção do gênero *Bacillus*, os outros grupos encontrados foram descritos pela primeira vez na microbiota superficial corporal de animais marinhos.

O gênero *Enterococcus* está presente em outras regiões da superfície cutânea, e não apenas na superfície cloacal das tartarugas.

O gênero *Staphylococcus* foi isolado da superfície corporal de tartarugas, assim como era esperado, porém em baixa abundância.

A alta taxa de resistência em todos os grupos submetidos sinaliza o alto índice de adaptação aos antimicrobianos existentes atualmente.

Não existe um bom entendimento sobre a microbiota marinha como um todo. Da mesma maneira, animais marinhos são pouco estudados pela dificuldade de coleta de materiais. Esta linha de pesquisa tende a ser promissora, tendo em vista a grande diversidade de microrganismos presente nos oceanos e seus potenciais biotecnológicos. São necessários maiores estudos sobre o ambiente aquático marinho para melhor compreensão dos organismos presentes neste habitat.

#### **5. AGRADECIMENTOS**

À Deus, por estar ao meu lado, onipresente.

À minha família, que esteve me enviando forças para continuar. Em especial, agradeço a minha mãe, que disponibilizou todo tempo e empatia para que eu realizasse

meu sonho de graduação e a memória de meu pai, que sempre será o meu maior exemplo.

À minha orientadora, Ana Frazzon, por todo o conhecimento compartilhado e também por ser uma pessoa de coração enorme e que acredita sempre no potencial daqueles que estão a sua volta.

À Letícia Costa, por todas as horas de ajuda disponibilizadas para a concretização deste trabalho e por me auxiliar a manter a calma nos momentos de estresse.

À todos os meus colegas do laboratório 222-C do Departamento de Microbiologia que me ampararam sempre que necessário, além de tornar as tardes de experimentos mais leves e alegres.

Aos meus amigos que compreenderam minha ausência em diversos momentos e estiveram, mesmo de longe, fornecendo o seu apoio. Agradeço em especial a Paola, Nicole, Julia, Gabriela e Jéssica por compartilharem comigo este momento e estarem sempre dispostas a ouvir quando eu mais precisava.

Ao Gustavo Ayres por ter me acompanhado nessa jornada durante os últimos cinco anos e por não me deixar fraquejar, acreditando no melhor de mim.

Por fim, agradeço a Sophia, por ser o anjo que entrou na minha vida, por me dar forças o tempo todo e por ser o meu motivo pra continuar.

## **6. REFERÊNCIAS**

ABAROA, MC., PÉREZ-VILLARREAL, B., BALD, C., RIESCO, S. & PICAZA, N. 2008. Frescura del pescado-guía visual para su evaluación sensorial. *ABAf*. No. 637.31.

AGUIRRE, A., BALAZS, G., ZIMMERMAN, B. & SPRAKER, T.. 1994. Evaluation of Hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*) for potential pathogens associated with fibropapillomas. *Journal of wildlife diseases*. 30. 8-15.

ALFARO, A., KØIE, M., & BUCHMANN, K. 2006. Synopsis of infections in sea turtles caused by virus, bacteria and parasites: An ecological review. *NOAA Tech. Memo*. NMFS SEFSC, 569.

ALMEIDA, B. C. 2009. Diversidade de bactérias em amostras de água do mar no Canal de São Sebastião. Tese de Doutorado (Instituto de Ciências Biomédicas). Universidade de São Paulo. São Paulo. 2009.

AKINBOWALE, O. L., PENG, H., & BARTON, M. D. 2006. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. *Journal of Applied Microbiology*, 100(5), 1103-1113.

ARVANITIDOU, M., KATSOUYANNOPOULOS, V., & TSAKRIS, A. 2001. Antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from coastal bathing waters. *Journal of medical microbiology*, 50(11), 1001-1005.

BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J. L. & CANTÓN, R. 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*. v. 19, p. 260 - 265, Jun.

BAPTISTOTTE, C., 1992. Tartarugas marinhas- Projeto TAMAR. 1992. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE HERPETÓLOGOS, 6. Belo Horizonte. Anais... [S.l.: s.n.], p 19-24.

BENITES NR, PESSOA, C., BANDINI, L., SAIDENBERG, A., MORENO, A., SAKATA, S., GOMES, C. & MELVILLE, P. 2013. Microbiota bacteriana e fúngica presentes na cloaca de Jabutis-Piranga (*Geochelone carbonaria*) criados em domicílio. *Vet. e Zootec. mar.*; 20(1): 102-110.

CATÃO, R.M.R. & CEBALLOS, B. S. O. 2001. *Listeria* spp., coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no estado da Paraíba (Brasil). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 21(3): 281-287.

CHARPENTIER, E., GERBAUD, G., & COURVALIN, P. 1993. Characterization of a new class of tetracycline-resistance gene tet(S) in *Listeria monocytogenes* BM4210. *Gene*, 131(1), 27-34.

CHARPENTIER, E., GERBAUD, G., & COURVALIN, P. 1994. Presence of the *Listeria* tetracycline resistance gene tet (S) in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 38(10), 2330-2335.

CHEN C, SUN L. 2017. Draft genome sequence of *Exiguobacterium* sp. HVEsp1, a thermophilic bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent in the Okinawa Trough. *Genome Announc* 5:e00253-17.

CLSI, 2017. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 27th ed. CLSI supplement M100–S26. Wayne, PA: *Clinical and Laboratory Standards Institute*.

COLLINS, M.D., BROWN, J. & JONES, D. 1988. *Brachybacterium faecium* gen. nov., sp. nov., a Coryneform Bacterium from Poultry Deep Litter. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Jan. p. 45-48.

CONTER, M., PALUDI, D., ZANARDI, E., GHIDINI, S., VERGARA, A., & IANIERI, A. 2009. Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*. *International journal of food microbiology*, 128(3), 497-500.

COPPOLA, M., & TURNES, C. 2004. Probióticos e resposta imune. *Ciência Rural*, 34(4).

COSTA LFX. 2018. Caracterização de *Enterococcus* sp. provenientes de amostras de fezes de morcegos *Tadarida brasiliensis*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul. 2018.

CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R. & CATÃO-DIAS, J. L., 2006 Tratado de animais selvagens: Medicina Veterinária. 2.ed. Roca. 2512p. São Paulo.

DIB, J. R., WEISS, A., NEUMANN, A., ORDOÑEZ, O., ESTÉVEZ, M. C., & FARIÁS, M. E. 2009. Isolation of bacteria from remote high altitude Andean lakes able to grow in the presence of antibiotics. *Recent patents on anti-infective drug discovery*, 4(1), 66-76.

DONATO, S. T. 2007. Comparação de métodos convencionais e semiautomatizados para identificação de *Enterococcus* spp. frente a Biologia Molecular em identificações discrepantes. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Fortaleza, Brasil, 86 f.

EL-SHENAWY, M., & EL-SHENAWY, M. 2006. *Listeria* spp. in the coastal environment of the Aqaba Gulf, Suez Gulf and the Red Sea. *Epidemiology and Infection*, 134(4), 752-757.

FERREIRA, T. C.; SILVA, D. P. & BETIOL, W. 2017. Resistência de diferentes cepas de *Bacillus* spp. a antibióticos. In: XL Congresso Paulista de Fitopatologia. Campinas. 2000.

GRASSOTTI TT, ZVOBODA DA, COSTA LFX, ARAÚJO AJG, PEREIRA RI, SOARES RO, WAGNER PGC, FRAZZON J & FRAZZON APG. 2018. Antimicrobial resistance profiles in *Enterococcus* spp. isolates from fecal samples of wild and captive Black Capuchin monkeys (*Sapajus nigritus*) in South Brazil. *Frontiers in Microbiology*. 9.

GORNIK, K., PIRIE, C., MARRION, R., WOCIAL, J. & INNIS, C. 2016. Ophthalmic variables in rehabilitated juvenile Kemp's ridley sea turtles (*Lepidochelys kempii*). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 248:6, 673-680.

IUCN - IUCN RED LIST OF THREATENED SPECIES. 2018. Disponível em: <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)> Acesso em: 17/11/2018.

IVANOVA, E., VYSOTSKII, M, SVETASHEV, V., NEDASHKOVSKAYA O., GORSHKOVA, N MIKHAILOV, V., YUMOTO, N., SHIGERI, Y., TAGUCHI, T. & YOSHIKAWA, S. 2000. Characterization of *Bacillus* strains of marine origin. *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology*. 2. 267-71.

MARTINEZ, J. L. 2003. Recent advances on antibiotic resistance genes. *Molecular Genetics of Marine Organisms*. v. 10, p. 13 – 32.

MEDEIROS, A. W.; AMORIM, B.; TAVARES, M., FRANCO, A. C., D'AZEVEDO, P. A, FRAZZON, J. FRAZZON, A. P. G. 2017. *Enterococcus* species diversity in fecal

samples of wild marine species as determined by real-time PCR. *Canadian Journal of Microbiology*. 63(2), 129-136.

MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L., 2008. *Microbiologia Ambiental*. 2. Ed. Rev. Ampl. – Jaguariúna: 647p. Embrapa Meio Ambiente.

MESQUITA, B. B., 2014. Diversidade de bactérias isoladas da superfície cutânea de tartarugas marinhas no litoral norte do Rio Grande do Sul. Trabalho de Conclusão de Curso. (Bacharel em Ciências Biológicas com Ênfase em Biologia Marinha) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Universidade Estadual do Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul. 2014.

MCARTHUR, S., WILKINSON, R. & MEYER, J. 2004. *Medicine and Surgery of Turtles and Tortoises*. Wiley-Blackwell. 549p.

MURRAY, P.; ROSENTHAL, K. S. & PFALLER, M. A. 2015. *Microbiologia médica* 7ªed. Elsevier Brasil, 776p.

NOWAKIEWICZ, A., ZIÓLKOWSKA, G., ZIĘBA, P., DZIEDZIC, B., 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. *Journal of Wildlife Diseases*: January 2015, Vol. 51, No. 1, pp. 255-259.

OLINDA, R. G., FEIJÓ, F. M. C., ALVES, N. D., AMORIM, R. N. L., ALVES, H. M., BATISTA, J. S., & OLIVEIRA, M. F. 2010. Otite bacteriana em cateto (Tayassu tajacu Linnaeus, 1758) criado em cativeiro. *Acta Veterinaria Brasilica*, 4(2), 113-117.

OLIVEIRA, T.S.; MILEN, L.; SILVA, L. N. N., PEREIRA, R. C. L.; VALLIM, D. C.; HOFER, E. & ALMEIRA, R. C. C. 2016. Susceptibilidade a Antimicrobianos de

Listeria monocytogenes isolada em abatedouro de frango. Anais do XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos <<http://www.ufrgs.br/xxvcbeta/anais>>, 24 a 27 de outubro de 2016. – Gramado: SBCTA Regional. Acesso em: 16/10/2018.

OPLUSTIL C.P., ZACOLI C.M. & TOBOUTI N.R. 2010. Procedimentos básicos em Microbiologia Clínica. 3ªEd. Editora Servier, São Paulo, 544p.

PARK, S., KIM, M., JUNG, M., NAM, Y., PARK, E., ROH S. & BAE, J. 2011. Brachybacterium squillarum sp. nov., isolated from salt-fermented seafood. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61: 1118-1122

PELCZAR, JR. CHAN, M. J. & KRIEG, E. C. 1996. Microbiologia: Conceitos e Aplicações. 2.Ed. São Paulo: Pearson Education of Brazil. V.2. 600p.

PEREIRA R. I. 2016. Diversidade genética e fatores de virulência de *Enterococcus* spp. isolados de amostras fecais de tartarugas marinhas recuperadas no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul.

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 Faecal Enterococci of Wild Animals in Portugal. *Journal of Veterinary Medicine*. 52:396-402.

PRICHULA J, PEREIRA RI, WACHHOLZ GR, CARDOSO LA, TOLFO NCC, SANTESTEVAN NA, MEDEIROS AW, TAVARES M, FRAZZON J, D'AZEVEDO PA & FRAZZON APG. 2016. Resistance to antimicrobial agents among enterococci isolated from fecal samples of wild marine species in the southern coast of Brazil. *Marine Pollution Bulletin*. 105(1):51-57.

PRIEST FG. 1977. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol Rev.* ;41:711–53.

SAEKI, E. K., FARHAT, L. P. & PONTES, E. A. Eficiencia dos crioprotetores glicérol leite desnatado para o congelamento dos microrganismos. *Acta Veterinaria Brasilica*, V.9. N.2. 2015.

RAICHAND, R., PAREEK, S., SINGH, N. K., & MAYILRAJ, S. 2012. *Exiguobacterium aquaticum* sp. nov., a member of the genus *Exiguobacterium*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(9), 2150-2155.

RAHIMI, E., AMERI, M., & MOMTAZ, H. 2010. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* species isolated from milk and dairy products in Iran. *Food Control*, 21(11), 1448-1452.

RAHMAN, M. H., SAKAMOTO, K. Q., KITAMURA, S. I., NONAKA, L., & SUZUKI, S. 2015. Diversity of tetracycline-resistant bacteria and resistance gene tet

(M) in fecal microbial community of Adélie penguin in Antarctica. *Polar Biology*, 38(10), 1775-1781.

SANTESTEVAN NA. 2014. Isolamento e avaliação de *Enterococcus* spp. obtidos de amostras fecais de lobos-marinhos (OTARIIDAE: *Arctocephalus* spp.) encontrados no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul.

SANTOS, L.L. 2011. Características da microbiota da superfície ocular bacteriana em animais domésticos e silvestres. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Curitiba.

SANTORO, M., HERNÁNDEZ, G., CABALLERO, M. & GARCÍA, F. 2006. Aerobic bacterial flora of nesting Green turtles (*Chelonia mydas*) from Tortuguero National Park, Costa Rica. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, Vol. 37, Issue 4, pg(s) 549-552

SINGLETON P. 1999. *Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine* (5th ed.). Wiley. pp. 444–454.

SOUZA, R. A. M. 2006. Comparação de diferentes protocolos terapêuticos na cicatrização de carapaça de Tigres-D'agua (*Trachemys* sp.). Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Paraná (UFPR).

TAUKEUCHI, M., FANG C. & YOKOTA A. Taxonomic Study of the Genus Brachybacterium: Proposal of Brachybacterium conglomeratum sp. nov., nom. rev., Brachybacterium paraconglomeratum sp. nov., and Brachybacterium rhamnosum sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 45(1):160-168.

TENA, D., MARTÍNEZ, N. M., CASANOVA, J., GARCÍA, J. L., ROMÁN, E., MEDINA, M. J., & SÁEZ-NIETO, J. A. 2014. Possible Exiguobacterium sibiricum skin infection in human. *Emerging infectious diseases*, 20(12), 2178-9.

TOMAZELLI, K. G., WERLANG, F., SANTANA, L. M., DEHON, M., BENDATI, M. M. D. A., VAN DER SAND, S. T., & CORÇÃO, G. 1997. Suscetibilidade a antibióticos em bactérias isoladas de amostras dos balneários do rio Guaíba. *Salão de Iniciação Científica (9.: 1997: Porto Alegre). Livro de resumos. Porto Alegre: UFRGS, 1997.*

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R. & CASE, C. L. Microbiologia, 2012. 10. Ed. Artmed. Porto Alegre. 964p.

VISHNIVETSKAYA, T. A., KATHARIOU, S., & TIEDJE, J. M. 2009. The Exiguobacterium genus: biodiversity and biogeography. *Extremophiles*, 13(3), 541-555.

YOSHIDA T., SUGIMOGO, T., SATO, M. & HIRAI, K. 2000. Incidence of Listeria monocytogenes in Wild Animals in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*. 62Ed., June, p. 673-675.

ZHAO, B., LIAO, L., YU, Y. & CHEN, B. 2017. Complete genome of Brachybacterium sp. P6-10-X1 isolated from deep-sea sediments of the Southern Ocean. *Marine Genomics*. Volume 35. Pages 27-29.