

Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul

Instituto de Biociências

Bacharelado em Ciências Biológicas

Trabalho de Conclusão de Curso

ANÁLISE DA MICROBIOTA BACTERIANA CLOACAL DE TARTARUGAS *Trachemys*  
*dorbigni* (Duméril & Bibron, 1835) E *Trachemys scripta elegans* (Wied, 1839) EM  
CATIVEIROS DO RS.

Julia Ienes Lima

Orientadora: Ana Paula Guedes Frazzon

Co-orientador: Márcio Borges Martins

Porto Alegre, 2018

Análise da microbiota bacteriana cloacal de tartarugas *Trachemys dorbigni* (Duméril & Bibron, 1835) e *Trachemys scripta elegans* (Wied, 1839) em catifeiros do RS.

Orientadora: Ana Paula Guedes Frazzon

Co-orientador: Márcio Borges Martins

Banca Examinadora:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marisa da Costa

Me. Alberto Araújo

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado à Comissão de Graduação do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Porto Alegre, 2018.

**Análise da microbiota bacteriana cloacal de tartarugas *Trachemys dorbigni* (Duméril & Bibron, 1835) e *Trachemys scripta elegans* (Wied, 1839) em cativeiros do RS.**

Julia Ienes Lima<sup>1\*</sup>, Márcio Borges Martins<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, n° 500 – 2° andar, sala 202. CEP: 90.050-170. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Herpetologia, Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43435. CEP: 91.501-970. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

\*Contato do autor: Julia Ienes Lima – [julia.ienes@outlook.com](mailto:julia.ienes@outlook.com)

Manuscrito formatado segundo as regras editoriais da Revista Brasileira de Biociências.

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

**Análise da microbiota bacteriana cloacal de tartarugas *Trachemys dorbigni* (Duméril & Bibron, 1835) e *Trachemys scripta elegans* (Wied, 1839) em cativeiros do RS.**

**RESUMO:** A introdução de espécies exóticas pode trazer prejuízos nas mais diversas áreas, do ponto de vista microbiológico, pode levar ao surgimento de doenças. No Rio Grande do Sul, as populações nativas de tartarugas-tigre-d'água (*T. dorbigni*) estão sendo afetadas pela introdução de tartarugas-de-ouvido-vermelho (*T. scripta elegans*), considerada exótica na região. O presente trabalho teve como objetivo analisar a diversidade bacteriana cloacal de tartarugas-tigre-d'água e tartarugas-de-ouvido-vermelho, verificar se a antropização afetou o perfil de susceptibilidade desses microrganismos a antimicrobianos, e verificar se as bactérias presentes em *T. scripta elegans* apresentam algum risco às tartarugas *T. dorbigni*. Foram realizadas coletas de suabes cloacais em cinco indivíduos de cada espécie de tartarugas, em dois cativeiros. A diversidade de bactérias foi determinada por meio de Maldi-TOF e o perfil de suscetibilidade das mesmas através do método de disco de difusão. Das amostras também foram isolados enterococos. Dezoito espécies bacterianas foram identificadas, sendo *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii* e *Raoultella ornithinolytica* as mais predominantes. As amostras de tartarugas-de-ouvido-vermelho apresentaram maior diversidade bacteriana, além disso nove espécies foram encontradas somente nelas, entre elas a *Edwardsiella tarda*, causadora de doenças em quelônios. Dos isolados submetidos ao teste de disco de difusão, 13 apresentaram algum tipo de resistência aos antibióticos testados. Como conclusão, as tartarugas-de-ouvido vermelho são portadoras de microrganismos que podem representar um risco às demais tartarugas, bem como para outros animais. Além disso, as tartarugas-de-ouvido-vermelho podem atuar como agentes etiológicos de novos patógenos a populações de tartarugas nativas, bem como para o habitat como um todo.

Palavras-chave: microbiologia de quelônios, resistência antimicrobiana, ecologia microbiana, conservação.

**Analysis of the bacterial microbiota in the cloacal of *Trachemys dorbigni* (Duméril & Bibron, 1835) e *Trachemys scripta elegans* (Wied, 1839) in captivity of the RS**

**Summary:** The introduction of exotic species bring wounded in several areas, in microbiological point of view, can lead to the emergence of diseases. In Rio Grande do Sul, the native populations of black-bellied slider (*T. dorbigni*) are being affected by the introduction of red-eared slider (*T. scripta elegans*), considered exotic in the region. The objective of the present work was to examine bacterial diversity cloacal of black-bellied slider and red-eared slider, tested if antibiotic was affected by anthropization of these microorganisms, and detect if the bacteria present in *T. scripta elegans* represent some risk to *T. dorbigni*. Cloacals swabs were collection in five individuals of each species of turtles in captivity. The diversity of bacteria was determined by means of Maldi-TOF and the susceptibility of antibiotic profile through the disk diffusion method. The samples also were isolated enterococi. Eighteen bacterial species were identified being *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii* and *Raoultella ornithinolytica* the more prevalent. Samples from red-eared slider showed higher bacterial diversity, besides nine species were found only in them, including the *Edwardsiella tarda*, causing diseases in turtles. Isolates submitted to the diffusion disc test, 13 showed some resistance to antibiotics tested. As a conclusion the red-eared slider are carriers of micro-organisms that may pose a risk the other turtles, as well as for other animals. In addition, the red-eared slider can act as etiological agents of new pathogens to populations of native turtles, as well as for the habitat as a whole.

**Keywords:** chelonians microbiology, antimicrobial resistance, microbial ecology, conservation.

## 1. INTRODUÇÃO

A introdução de espécies exóticas em ambientes naturais tem sido um grande problema nos dias atuais, pois as mesmas podem ser responsáveis por desequilíbrios ecológicos nas comunidades. Uma espécie quando introduzida fora de seu local de ocorrência natural pode se tornar uma grande competidora de espécies nativas, limitando fontes de alimento, abrigos e até predando alguma espécie. Além disso, por não estar em seu habitat natural, a espécie exótica pode estar livre de predadores específicos, intensificando ainda mais o seu poder invasivo (Coutinho, 2002). Outro problema é que a introdução de espécies exóticas pode modificar o habitat, causando o rompimento do isolamento reprodutivo entre as espécies nativas.

Nesse trabalho, as espécies de estudo pertencem à ordem Testudines e à família Emydidae. Entre as espécies do gênero *Trachemys*, destacam-se a *Trachemys dorbigni* (Duméril & Bibron, 1835), vulgarmente conhecida como tartaruga-tigre-d'água e a *Trachemys scripta elegans*, popularmente conhecida como tartaruga-de-ouvido-vermelho (Figura 1).



**Figura 1.** Indivíduos de *T. dorbigni* (E) e *T. scripta elegans* (D) no “Lago das Tartarugas”, localizado no Parque Zoológico de Sapucaia.

A espécie *T. dorbigni* é mais abundante na região sul do Brasil, onde ocorre naturalmente, bem como no Uruguai e no norte da Argentina. Tem-se o conhecimento de que os indivíduos dessa espécie são onívoros oportunistas (Bujes *et al.* 2011). Já a *T. scripta elegans* (Weid, 1839), é uma tartaruga semi-aquática e considerada exótica visto que ocorre naturalmente no Texas, Novo México, partes indeterminadas no nordeste do México, Oklahoma, leste de Kansas, leste de Indiana, Kentucky, Tennessee e Alabama (Rossi *et al.* 2006). Em habitat natural esses animais possuem hábito alimentar herbívoro, no entanto, também podem ser onívoros, alimentando-se de insetos, pequenos peixes, bem como ovos e ossos de anfíbios e roedores (Rossi *et al.* 2006). Em cativeiro, possuem uma dieta estritamente onívora, tendo preferência por carnes e rações para gatos, cães e específicas para tartarugas. Além disso, também se alimentam de verduras e frutas, porém estes, com menor interesse (Rossi *et al.* 2006).

No Brasil, *T. scripta elegans* é uma espécie exótica que pode ser encontrada facilmente em lojas de animais e em bancas de feirantes (Coutinho, 2002). No entanto, muitos compradores acabam soltando esses animais em locais públicos – como praças e parques que possuam pequenos lagos – quando o espécime atinge um tamanho maior, e com isso, o animal acaba se adaptando ao local. Outra consequência da introdução de *T. scripta elegans* no Brasil é a possível hibridização com espécies nativas, podendo resultar em descendentes com baixa aptidão através da introgressão, na espécie nativa, de alelos menos adaptados ao contexto ecológico local (Figueiredo, 2014). No Rio Grande do Sul, as populações de *T. dorbigni* estão sendo afetadas pela introdução de *T. scripta elegans*, visto que Figueiredo (2014) já apontou a ocorrência de hibridização entre as duas espécies.

Do ponto de vista microbiológico, a introdução de espécies exóticas também pode causar o surgimento de doenças em humanos e aos outros animais, devido à diferente microbiota da qual esses animais são portadores. Visto isso, é necessário ter conhecimento dessa comunidade microbiana para compreender se a mesma pode causar danos mais graves ao novo local colonizado e para os demais indivíduos que ali ocorrem.

O microbioma é o conjunto de diversos microrganismos que estão presentes em um organismo. Esses microrganismos são muito importantes, pois estão envolvidos em vias metabólicas, modificando-as a ponto de influenciar, inclusive, em alguns padrões comportamentais do hospedeiro. Esses microrganismos ajudam na aquisição de nutrientes e na resposta imunológica do hospedeiro, e podem influenciar no comportamento,

desenvolvimento, reprodução e a saúde geral do organismo hospedeiro (Colston & Jackson, 2016). De acordo com Colston & Jackson (2016), a influência do hospedeiro sobre seu microbioma ainda está sendo determinada. No entanto, tem-se o conhecimento que tanto a dieta do hospedeiro, quanto a filogenia mostram-se importantes preditores da composição da comunidade microbiana endógena. Goodrich *et al.* (2016) afirmaram que estas comunidades microbianas variam em composição em todo o corpo, dependendo dos nichos definidos física, química e imunologicamente.

Yuan *et al.* (2015) analisaram amostras fecais de tartarugas-do-deserto (*Gopherus polyphemus*) e demonstraram que há uma pequena associação entre a estrutura do microbioma e o parentesco, visto que fora encontrado semelhança entre o microbioma de indivíduos irmãos e de pais em relação à prole. Essas relações podem ter surgido através da transmissão parental direta durante o desenvolvimento do ovo, da interação entre os irmãos no ninho, ou até mesmo por coprofagia influenciada por parentes próximos.

Quando quelônios são criados com outras espécies, em especial mamíferos, que também possuem enterobactérias em sua microbiota intestinal, estas podem provocar doenças cutâneas ulcerativas, e assim levar ao desenvolvimento de quadros septicêmicos, como necrose hepática, anorexia, caquexia e morte (Jacobson, 2007). Répteis em geral são capazes de portar uma grande variedade de patógenos que podem causar infecções em humanos, sendo as bactérias potenciais patógenos responsáveis por diversas zoonoses nesses animais (Ebani, 2005). A contaminação do ambiente é uma forma de disseminar bactérias resistentes, principalmente em grandes centros urbanos. Esta situação torna-se demasiadamente preocupante no momento em que são encontradas bactérias comensais resistentes aos antimicrobianos em populações de animais selvagens.

Com base nos aspectos ecológicos e microbiológicos relacionados à introdução de espécies exóticas, o presente trabalho tem como objetivos: a) identificar e comparar a diversidade de bactérias cultiváveis presentes na cloaca de tartarugas das espécies *T. dorbigni* e *T. scripta elegans* provenientes de ambientes de recuperação, considerados como cativos; b) verificar o perfil de suscetibilidade desses microrganismos a antimicrobianos; e c) verificar se as bactérias presentes na cloaca de *T. scripta elegans* apresentam algum risco em relação a patógenos, às tartarugas *T. dorbigni*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### *Área de Estudo*

O presente trabalho abordou duas áreas de estudo, o Parque Zoológico de Sapucaia (PZS) e o Centro de Reabilitação de Animais Silvestres e Marinhos (CERAM).

**Parque Zoológico de Sapucaia (PZS):** A primeira coleta foi realizada em outubro de 2017 no Parque Zoológico de Sapucaia. O Zoológico pertence à Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul (FZB/RS), a qual está vinculada, desde 1999, à Secretaria do Meio Ambiente do RS (SEMA-RS). O PZS está situado no município de Sapucaia do Sul (RS) (29°48'05.1"S, 51°09'59.2"W), e possui uma área total de 780 hectares (ha) - sendo 620 ha pertencentes a área de Reserva Florestal Padre Balduino Rambo e 160 ha ao zoológico propriamente dito. O Zoológico abriga aproximadamente 130 espécies de animais, entre aves, répteis e mamíferos. Ele também mantém e possibilita a reprodução de animais, inclusive de espécies ameaçadas de extinção e espécimes incapazes de retornar ao seu habitat natural.

As tartarugas do gênero *Trachemys* são alojadas em dois ambientes de acordo com sua procedência. As tartarugas provenientes de fora do Zoológico – encaminhadas pela Patrulha Ambiental da Brigada Militar da Região Sul (PATRAM-RS) para reabilitação, ou devido a abandono – são alocadas em um recinto isolado, onde há um pequeno lago no qual as mesmas podem banhar-se; e em um lago maior, há as tartarugas que nasceram no Parque Zoológico, onde vivem em contato com outras espécies de animais, como cisnes e gansos, numa espécie de habitat natural. No entanto, para este trabalho, foram utilizadas somente as tartarugas pertencentes ao primeiro ambiente (Figura 2A). É de suma importância científica o trabalho realizado no PZS, visto que o mesmo visa contribuir para a formação de mentalidade conservacionista, cumprindo assim com suas funções de pesquisa, conservação, educação ambiental, lazer e turismo (Parque Zoológico, 2012).



**Figura 2.** Locais onde as amostras foram coletadas: A) “Lago das Tartarugas”, no Parque Zoológico, em Sapucaia do Sul, RS; B) Piscina onde as tartarugas são mantidas após a reabilitação no CECLIMAR, em Imbé, RS.

**Centro de Reabilitação de Animais Silvestres e Marinhos (CERAM):** A segunda coleta foi realizada CERAM, localizado no Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos (CECLIMAR) no município de Imbé (RS) (29°58’25.1”S, 50°08’13.9”W). O CERAM tem como objetivo o atendimento qualificado a espécimes da fauna costeira e marinha que sofreram algum impacto antrópico, tais como vazamentos de petróleo, interação com atividade pesqueira, poluição marinha, e a realização de pesquisas sobre biologia, ecologia e medicina veterinária destes indivíduos (CERAM, 2018). De acordo com o *website* do CERAM, o mesmo também tem como objetivo a educação da população e comunidade em geral no que tange os aspectos de seleção natural relacionado a estes animais e uma gestão ambiental mais adequada da zona costeira, visando a atenuação das pressões antrópicas e da interferência na rotina de vida dos animais na natureza.

Primeiramente, antes de serem alocadas, as tartarugas que chegam ao CERAM são submetidas a uma análise do quadro clínico para verificação do estado de saúde em que esses animais se encontram. Nesse momento são verificados parâmetros como peso e tamanho de

carapaça, patologias aparentes, ferimentos no corpo, etc. Após realizada essa análise, os animais ficam em quarentena em um tanque específico, onde ali permanecem recebendo medicação quando necessária, até que estejam saudáveis para serem transferidos para outro tanque com as demais espécies.

O segundo ambiente é uma piscina de fibra, de aproximadamente 15.000 l, onde as tartarugas saudáveis se encontram (Figura 2B). Esse ambiente, no entanto, está localizado fora das dependências do CERAM, mas ainda dentro do CECLIMAR. Neste tanque há duas espécies de tartarugas –*T. dorbigni* e *T. scripta elegans* - uma espécie de cágado – *Phrynops hilarii* - e alguns indivíduos híbridos dessas espécies, os quais ainda não foram sistematicamente classificados. Devido a pouca quantidade de tartarugas que havia no local, foram utilizadas tartarugas dos dois ambientes do CECLIMAR.

### ***Coleta das amostras***

Foram selecionadas 5 fêmeas jovens das espécies *T. dorbigni* e *T. scripta elegans* em cada um dos pontos de coleta (PZS e CERAM), totalizando 20 espécimes. Os animais foram contidos fisicamente e alocados em um tanque, separados dos demais, em seguida, informações como peso, tamanho da carapaça e tamanho do plastrão foram medidos e registrados antes de realizar a coleta de suabe cloacal.

Foi introduzido na cloaca de cada espécime um suabe estéril, e realizado movimentos circulares por cerca de 30 segundos. Os suabes foram armazenados em Meio Stuart para transporte até o Laboratório de Microbiologia Ambiental, localizado no Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, onde foram mantidos sob refrigeração até a realização das análises microbiológicas.

### ***Análise da diversidade bacteriana***

Os suabes cloacais das tartarugas foram mergulhados em 3 mL de Água Peptonada, por 24h à 37°C. Seguidamente, 100 µL foram utilizados para diluição seriada em solução salina 0,85%, até  $10^{-5}$ , e então, as diluições  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  foram plaqueadas em meio Ágar Infusão de Cérebro e Coração (BHIA, *Brain Heart Infusion Agar*) em duplicata, e incubadas por 24h à 37°C, posterior a esse período de incubação foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC). As demais diluições foram descartadas devido a impossibilidade de contagem das UFC decorrente da formação de tapete bacteriano sobre o ágar.

Foram selecionadas 10 colônias morfológicamente diferentes de cada amostra, e as mesmas foram semeadas em BHIA seguidas de incubação por 24h à 37°C. Posteriormente, as características fenotípicas das colônias foram analisadas, tais como morfologia e pigmentação, seguidos de realização de testes de coloração de Gram e catalase. Por fim, os isolados foram armazenados em solução contendo 10% de leite desnatado em pó (Molico, Nestlé®) e glicerol 10% (v/v), sob refrigeração à -20°C para posterior identificação das espécies.

### ***Isolamento de Enterococcus***

Para o isolamento de enterococos foi utilizado como base a metodologia realizada por Prichula (2014). Os suabes cloacais foram adicionados em tubos contendo 3mL de Água Peptonada estéril, e incubados em estufa bacteriológica por 24h à 37°C. Após incubação, 1mL deste inóculo foi adicionado em 9mL de Caldo Azida Dextrose – um meio de cultura que possui propriedades seletivas para enterococos e estreptococos, devido à capacidade de inibir o transporte de elétrons (Huff, 2016) – que também fora incubado sob as mesmas condições.

Foram realizadas diluições seriadas a partir de 1mL da solução de Caldo Azida, em 9 mL de solução salina 0,85% estéril, até a diluição  $10^{-2}$  e então, uma alíquota de 100uL desta diluição foi semeada pelo método de espalhamento em superfície em Ágar BHIA contendo NaCl 6,5%, em duplicata. As placas foram incubadas por 48 h à 37°C. Enterococos toleram altas salinidades durante seu crescimento, devido a isso o cloreto de sódio é utilizado como meio seletivo, no entanto, neste trabalho não foi possível isolar *Enterococcus* sp. sob essas condições, portanto, reduzimos a concentração de NaCl para 3,5%, e então, foi possível obter crescimento desses microrganismos.

Posteriormente, 10 colônias isoladas foram selecionadas aleatoriamente e semeadas em placas de Ágar Bile Esculina (BEA), seguido de incubação por 24 h à 37°C. O BEA foi utilizado por permitir uma identificação presuntiva para o gênero *Enterococcus*, pois os mesmos são capazes de realizar a hidrólise da esculina na presença de bile, gerando glicose e esculetina. Esta última reage com íons de ferro presentes no meio, resultando em uma coloração escura no meio de cultura (Huff, 2016). As colônias positivas para bile foram semeadas por esgotamento em ágar BHI, incubadas sob as mesmas condições anteriores. Após o período de incubação, foram submetidas ao teste da catalase, e à coloração de Gram,

e em seguida foram armazenadas em solução contendo 10% de leite desnatado em pó (Molico, Nestlé®) e glicerol 10% (v/v), sob refrigeração à -20°C.

### ***Identificação dos isolados bacterianos***

A identificação das espécies bacterianas foi realizada através de Maldi-TOF, equipamento que utiliza os princípios da espectrometria de massa a partir de proteínas como base para identificação dos microrganismos. Para submeter as amostras para a análise, foi necessário realizar dois repiques em meio BHIA – pois as mesmas já se encontravam em meio Molico – seguido de incubação por 24h à 37°C cada. A partir da cultura obtida no segundo repique, uma mistura de colônias foi adicionada a 300µL de água milli-Q estéril, e em seguida foi adicionado 900µL de etanol absoluto. Por fim, a solução foi homogeneizada em vortex e as amostras foram armazenadas à 4°C, por no máximo 7 dias.

### ***Extração de DNA para análise do gene 16S***

A fim de determinar a espécie bacteriana das amostras que não foram identificadas por Maldi-TOF, foi realizada a extração de DNA total conforme descrito em Donato *et al.* (2004) para posterior envio das amostras para sequenciamento. Para tal, foi retirada uma alíquota da amostra que estava armazenada em leite desnatado e glicerol, e semeada por esgotamento em ágar BHI, seguido de incubação em estufa bacteriológica por 24h à 37°C. Posterior a incubação, foi transferida uma alíquota deste crescimento para 2mL de caldo BHI, que foi incubado por 24 h à 37°C. Logo após, foi transferido 1mL deste crescimento para um microtubo eppendorf de 1,5mL, seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 4 min. O sobrenadante foi descartado, e depois foi adicionado 40µL de solução de lise [5 mL de NaOH 1M; 2,5 mL de SDS 10% (Dodecil Sulfato de Sódio)] para ressuspender o precipitado. Este, foi submetido a banho seco por 15 min à 100°C, seguido de diluição em 460uL de tampão TE 1X [Tris HCl 1M, EDTA 0,5M, pH 8,0] e centrifugação à 14.000 rpm por 4 min. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para um no microtubo eppendorf de 0,6mL, e armazenado sob refrigeração a -20°C.

### ***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, 2017). Para a realização do antibiograma, foram utilizados os seguintes antimicrobianos (as concentrações foram expressas em ug mL<sup>-1</sup>): Amicacina (AMI 30),

Ampicilina + Sulbactam (ASB 20), Cloranfenicol (CLO 30), Cefoxitina (CFO 30), Ciprofloxacina (CIP 5), Estreptomicina (EST 10), Gentamicina (GEN 10) e Tetraciclina (TET 30). Os isolados estavam em solução de leite desnatado (Molico, Nestlé®), e foram repicados em BHIA por método de esgotamento e incubados em estufa bacteriológica por 24 h à 37°C. Posteriormente, colônias puras foram selecionadas e diluídas em 5mL de solução salina 0,85%, até atingir a turvação equivalente à solução padrão 0,5 da escala de McFarland (equivalendo a  $10^8$  UFC/mL).

Em seguida, um suabe estéril foi embebido na solução e foi realizado estrias em 3 direções em placas de meio de cultura Ágar Müller-Hinton. Posteriormente, os discos contendo os antimicrobianos foram colocados sobre a superfície dos meios, e as placas foram incubadas por 24 h à 37°C, para posterior medição e interpretação do diâmetro dos halos de inibição.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### *Diversidade bacteriana*

Foram obtidos 180 isolados, destes, 90 eram provenientes de suabes cloacais de tartarugas *T. dorbigni*, e 90 de *T. scripta elegans* (Tabela 1). Em duas amostras de suabes cloacais, uma de *T. scripta elegans* e outra de *T. dorbigni* ( $n = 9$ ) não foi possível isolar microrganismos.

Dos 180 isolados, 129 (72 %) foram identificados através do Maldi-TOF e 51 (28 %) não foram identificados, sendo classificados como “espécies não identificadas”. O Maldi-TOF é um equipamento cujo banco de dados é composto em sua maioria por amostras clínicas, sendo esta é uma limitação do emprego deste equipamento quando são analisadas amostras não clínicas.

Em relação à riqueza de diversidade bacteriana, foram isoladas 18 espécies de bactérias no total, havendo uma prevalência de bactérias Gram-negativas (83 %;  $n = 15$ ) em relação a bactérias Gram-positivas (17 %;  $n = 3$ ). Dentre as bactérias Gram-negativas, *Hafnia alvei* foi a espécie mais abundante, representando 24% ( $n = 43$ ) dos isolados, seguidamente de *Citrobacter freundii* (10%;  $n = 17$ ), *Morganella morganii* (8%;  $n = 14$ ) e *Raoultella ornithinolytica* (8%;  $n = 14$ ).

Os 51 isolados que não foram identificados como espécies foram separados baseados em características morfológicas e teste de catalase (Tabela 2). A maioria dos quais, caracterizou-se como Gram-negativos ( $n = 41$ ). A identificação destas espécies será realizada posteriormente por sequenciamento da região *16S do rRNA*.

Em relação ao local de coleta, das amostras de tartarugas provenientes do PZS foram obtidos 90 isolados, sendo destes, 72 identificadas a nível de espécie e 18 não puderam ser identificadas. A análise por Maldi-TOF identificou 11 espécies bacterianas presentes nas tartarugas do PZS ( $n = 9$ ), sendo *H. alvei* (78 %;  $n = 7$ ) e *R. ornithinolytica* (44 %;  $n = 4$ ) as mais abundantes. Oito das 11 espécies foram isoladas somente em tartarugas-de-ouvido-vermelho, as quais foram *Aeromonas* sp. (33,3 %;  $n = 3$ ), *Edwardsiella tarda* (22,2 %;  $n = 2$ ), *Proteus hauseri* (22,2 %;  $n = 2$ ), *Klebsiella oxytoca* (11,1 %;  $n = 1$ ), *Staphylococcus haemolyticus* (11,1 %;  $n = 1$ ) e *Yersinia frederiksenii* (11,1 %;  $n = 1$ ) (Tabela 1).

Já nas tartarugas provenientes do CERAM/CECLIMAR ( $n = 9$ ) foram identificados 57 isolados, sendo um total de 12 espécies bacterianas distintas. As mais abundantes foram *H. alvei* (55,6%;  $n = 5$ ) e *C. freundii* (44%;  $n = 4$ ). Diferente do que foi observado no PZS, a microbiota de ambas espécies de tartarugas apresentou maior similaridade, embora tenha sido observado a abundância de algumas espécies bacterianas somente em uma espécie de tartaruga. Nas tartarugas oriundas do CERAM/CECLIMAR, *Aeromonas* sp. (33 %;  $n = 3$ ), *Enterococcus faecalis* (33 %;  $n = 3$ ), *Shewanella putrefaciens* (22 %;  $n = 2$ ) e *Escherichia coli* (11 %,  $n = 1$ ) foram isoladas somente a partir de amostras de tartarugas-tigre-d'água, porém em baixa abundância. As espécies que foram isoladas somente em amostras de tartarugas-de-orelha-vermelha foram *Enterobacter asburiae* (11 %,  $n = 1$ ), *Enterococcus casseliflavus* (11 %,  $n = 1$ ) e *Plesiomonas shigelloides* (11 %,  $n = 1$ ), todas encontradas em poucos indivíduos. Trinta e três isolados não puderam ser identificados (Tabela 1).

**Tabela 1.** Isolados bacterianos obtidos de cada espécie de tartaruga *Trachemys* em ambos os pontos de coleta.

| Bactéria                           | <i>T. dorbigni</i> |           |          | <i>T. scripta elegans</i> |           |          | Total isolado | %           |
|------------------------------------|--------------------|-----------|----------|---------------------------|-----------|----------|---------------|-------------|
|                                    | PZ                 | CM        | Subtotal | PZ                        | CM        | Subtotal |               |             |
| <b>Gram-positivas</b>              |                    |           |          |                           |           |          |               |             |
| <i>Enterococcus casseliflavus</i>  | 0                  | 0         | 0        | 0                         | 1         | 1        | 1             | 0.56%       |
| <i>Enterococcus faecalis</i>       | 0                  | 4         | 4        | 0                         | 0         | 0        | 4             | 2.22%       |
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i> | 0                  | 0         | 0        | 1                         | 0         | 1        | 1             | 0.56%       |
| <b>Gram-negativas</b>              |                    |           |          |                           |           |          |               |             |
| <i>Aeromonas sp.</i>               | 0                  | 3         | 3        | 1                         | 0         | 1        | 4             | 2.22%       |
| <i>Aeromonas hydrophila</i>        | 0                  | 0         | 0        | 2                         | 0         | 2        | 2             | 1.11%       |
| <i>Aeromonas veronii</i>           | 0                  | 2         | 2        | 0                         | 0         | 0        | 2             | 1.11%       |
| <i>Citrobacter freundii</i>        | 8                  | 3         | 11       | 1                         | 5         | 6        | 17            | 9.44%       |
| <i>Edwardsiella tarda</i>          | 0                  | 0         | 0        | 4                         | 0         | 4        | 4             | 2.22%       |
| <i>Enterobacter asburiae</i>       | 0                  | 0         | 0        | 0                         | 2         | 2        | 2             | 1.11%       |
| <i>Escherichia coli</i>            | 0                  | 2         | 2        | 0                         | 0         | 0        | 2             | 1.11%       |
| <i>Hafnia alvei</i>                | 13                 | 11        | 24       | 11                        | 8         | 19       | 43            | 23.89%      |
| <i>Klebsiella oxytoca</i>          | 0                  | 0         | 0        | 2                         | 0         | 2        | 2             | 1.11%       |
| <i>Morganella morganii</i>         | 0                  | 2         | 2        | 10                        | 2         | 12       | 14            | 7.78%       |
| <i>Plesiomonas shigelloides</i>    | 0                  | 0         | 0        | 0                         | 2         | 2        | 2             | 1.11%       |
| <i>Proteus hauseri</i>             | 0                  | 0         | 0        | 11                        | 0         | 11       | 11            | 6.11%       |
| <i>Raoultella ornithinolytica</i>  | 6                  | 4         | 10       | 1                         | 3         | 4        | 14            | 7.78%       |
| <i>Shewanella putrefaciens</i>     | 0                  | 3         | 3        | 0                         | 0         | 0        | 3             | 1.67%       |
| <i>Yersinia frederiksenii</i>      | 0                  | 0         | 0        | 1                         | 0         | 1        | 1             | 0.56%       |
| Spp. não identificada              | 13                 | 16        | 29       | 5                         | 17        | 22       | 51            | 28.33%      |
| <b>Total isolado</b>               | <b>40</b>          | <b>50</b> |          | <b>50</b>                 | <b>40</b> |          | <b>180</b>    | <b>100%</b> |

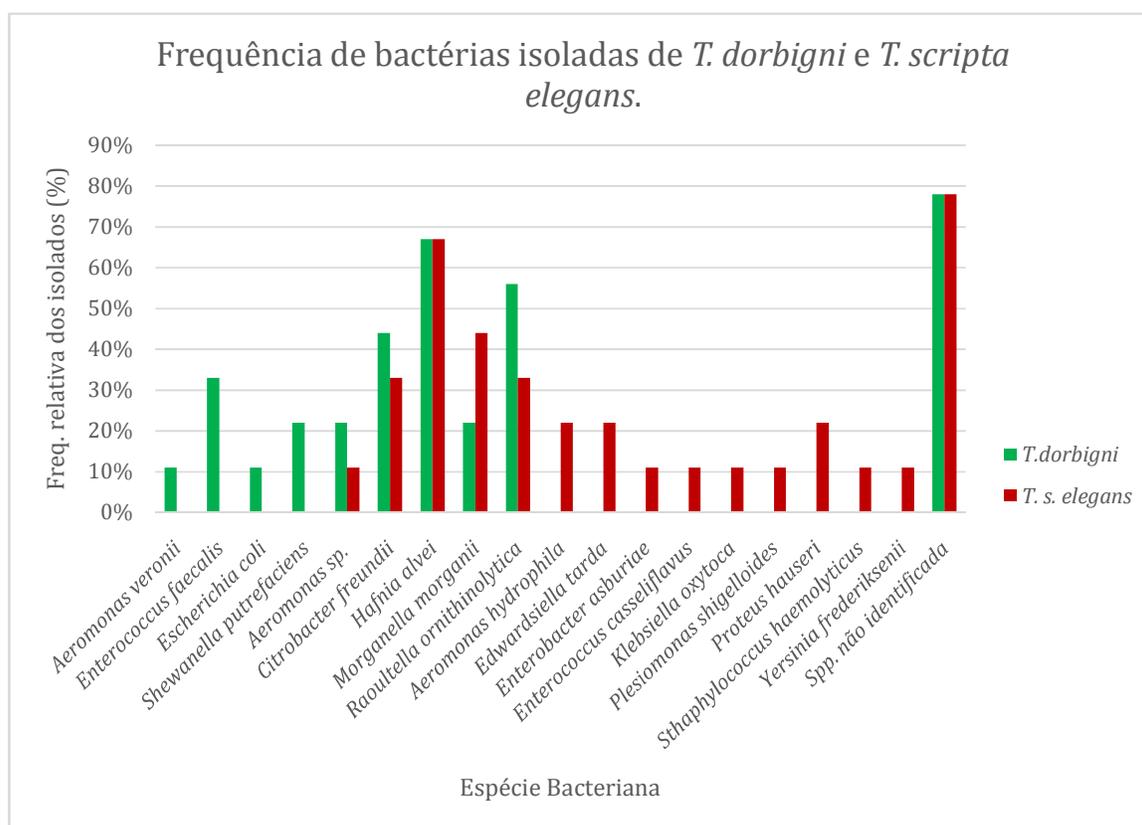
\* Spp.: espécies; PZ: Parque Zoológico; CM: CERAM-CECLIMAR.

**Tabela 2.** Resultado dos testes de coloração de Gram e dos testes de catalase realizados nos isolados cuja espécie não foi identificada por Maldi-TOF ( $n = 51$ ).

| Gram            | Catalase  |           | Total     |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|
|                 | Positivo  | Negativo  |           |
| <b>Positivo</b> | 0         | 10 (20 %) | <b>10</b> |
| <b>Negativo</b> | 25 (49 %) | 16 (31 %) | <b>41</b> |

Quanto à presença das bactérias na cloaca de *T. scripta elegans* e *T. dorbigni*, cinco grupos de bactérias estavam presentes em ambas espécies de tartarugas analisadas. A *H. alvei* foi observada em igual frequência em ambas as espécies de tartarugas analisadas (67 %). Já, as espécies *C. freundii*, *R. ornithinolytica* e *Aeromonas sp.* foram mais abundantes nas amostras de *T. dorbigni*, quando comparadas com *T. scripta elegans*. Por outro lado, *M.*

*morganii* foi isolada em maior frequência em *T. scripta elegans* (44 %)(Figura 2). Dentre as espécies bacterianas identificadas em tartarugas *T. dorbigni*, quatro espécies tiveram ocorrência somente nestes indivíduos, sendo elas *Aeromonas veronii* (11 %), *E. faecalis* (33 %), *E. coli* (11 %) e *S. putrefaciens* (22 %). Já entre os indivíduos de *T. scripta elegans* as espécies bacterianas que foram identificadas somente em tartarugas-de-ouvido-vermelho foram: *Aeromonas hydrophila* (22 %), *Edwardsiella tarda* (22 %), *E. asburiae* (11 %), *E. casseliflavus* (11 %), *Klebsiella oxytoca* (11 %), *Plesiomonas shigelloides* (11 %), *Proteus hauseri* (22 %), *Staphylococcus haemolyticus* (11 %) e *Yersinia frederiksenii* (11 %) (Figura 2). Ao todo, nove espécies bacterianas foram encontradas somente em tartarugas *T. scripta elegans*, o que indica que a espécie exótica realmente apresentou uma microbiota diferente da tartaruga nativa, e que pode estar atuando como hospedeiro para patógenos que possivelmente causam doenças em tartarugas, como a *E. tarda* que causa doença em quelônios.



**Figura 3.** Frequência dos microrganismos identificados nas tartarugas *T. dorbigni* (n=9) e *T. scripta elegans* (n=9) analisadas em ambos locais de coleta.

*Hafnia alvei* é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa, que compõe a microbiota intestinal de humanos, no entanto tem sido associada como a causa de doenças do

trato gastrointestinal (Okada & Gordon, 2003). Esta bactéria também faz parte da microbiota de aves, répteis e peixes (Moreno, 2009). *Hafnia alvei* é comumente isolada em ambientes naturais como na água e no solo, e também pode ser encontrada em esgotos (Moreno, 2009, Padilla *et al.* 2014). Esse agente se comporta como patógeno oportunista pouco comum, que pode causar infecções nosocomiais, como gastroenterite, bacteremia, pneumonia, meningite, infecções de feridas pós-operatórias, endoftalmite e abscesso glúteo em humanos (Moreno, 2009). No entanto, ainda não há estudos em relação a patogenicidade de *H. alvei* sobre tartarugas. A prevalência de *H. alvei* neste trabalho foi similar aos resultados obtidos por Nowakiewicz *et al.* (2015), onde foi realizada uma análise comparativa da microbiota cloacal de cágados-de-carapaça-estriada (*Emys orbicularis*) entre espécimes jovens criados em cativeiro, e adultos provenientes de hábitat natural. Os indivíduos adultos de hábitat natural apresentaram uma maior diversidade bacteriana do que os espécimes juvenis. Neles foram isoladas algumas espécies que são consideradas como uma potencial ameaça à saúde pública, como *Salmonella* sp., e também foram isolados agentes etiológicos de doenças de animais ectotérmicos, sendo *H. alvei* uma delas, bem como *Aeromonas sobria*, *Aeromonas caviae*, *E. tarda* e *C. braakii*.

*Citrobacter freundii* é uma bactéria Gram-negativa, aeróbia ou facultativa, considerada uma espécie comensal do trato intestinal de humanos e outros animais (Hossain *et al.* 2017). *Citrobacter freundii* tem prevalência no solo e na água, e por isso, é comumente encontrada em répteis, principalmente em infecções de tartarugas (Hossain *et al.* 2017). É considerado como o principal agente etiológico da Doença Ulcerativa Cutânea Septicêmica (Septicaemic Cutaneous Ulcerative Disease, SCUD) (Soccini & Ferri, 2004), que causa lesões na carapaça de quelônios, e a partir disso, pode promover simultaneamente quadros de anorexia, letargia e septicemia, podendo levar o espécime a óbito (Rangel-Mendoza *et al.* 2014). A SCUD pode ser transmitida horizontalmente para outras tartarugas em poucos dias, principalmente em condições de cativeiro (Hossain *et al.* 2017). Assim como neste trabalho, o isolamento de *C. freundii* a partir de suabes cloacais de tartarugas *T. scripta elegans* provenientes de zoológicos também fora observada por Chiaccio *et al.* (2014), o que indica que esses microrganismos podem ser comumente encontrados nesses ambientes.

Outra espécie muito observada entre as amostras de tartarugas neste trabalho foi *M. morganii*, uma bactéria Gram-negativa, comumente encontrada no ambiente e no trato intestinal de humanos, demais mamíferos e répteis como componente natural da microbiota (Wimalasena *et al.* 2017). De acordo com Di Ianni *et al.* (2015), *M. morganii* é uma causa

incomum de infecções nosocomiais em humanos, todavia, tem sido isolada principalmente de infecções do trato urinário, e pode estar relacionada com a sepse neonatal. Em anfíbios e répteis *M. morganii* pode estar envolvida em várias infecções, como pneumonia, peritonite, empiema, pericardite, artropatia, endoftalmite, meningite, entre outros (Wimalasena *et al.* 2017). Recente, *M. morganii* foi isolada de um espécime de *T. scripta* que apresentava sinais de conjuntivite, e neste mesmo indivíduo, também fora isolado *S. haemolyticus* (Di Ianni *et al.* 2015).

*Raoultella ornithinolytica* é um bacilo Gram-negativo, encapsulado, que habita ambientes aquáticos e recentemente tem sido isolada de ambientes hospitalares (Seng *et al.* 2016). O gênero *Raoultella* já havia sido isolado em quelônios anteriormente, inclusive em tartarugas *T. scripta elegans*. Chiacchio *et al.* (2014) isolaram *R. planticola* de amostras de suabe cloacal de tartarugas-de-orelha-vermelha oriundas do Zoológico Municipal de Guarulhos, São Paulo. Esse dado em conjunto com o resultado obtido no presente estudo, indica que bactérias do gênero *Raoultella* podem ser comuns em ambientes como zoológicos, visto que neste trabalho, *R. ornithinolytica* fora isolada predominantemente no Parque Zoológico de Sapucaia, em tartarugas-tigre-d'água.

*Edwardsiella tarda* é uma bactéria Gram-negativa, que compõe a microbiota do trato digestivo de répteis como crocodilos e tartarugas, e também pode ser encontrada em cobras e sapos (Shin *et al.* 2017, Marsh & Gorbach, 1982). Como fora apresentado por Nowakiewicz *et al.* (2015), *E. tarda* é um dos principais causadores de doenças em animais ectotérmicos. Este microrganismo é considerado como um dos causadores de septicemia em crocodilos, e, em humanos tem sido associado a diversas doenças como gastroenterite, meningite, colecistite, endocardite, osteomielite, mionecrose, infecções dos tecidos moles, bacteremia e septicemia (Shin *et al.* 2017). Ao oposto do que fora encontrado por Santos *et al.* (2011), *E. tarda* não foi isolada em abundância, no entanto, assim como neste respectivo trabalho, a ocorrência na espécie *T. scripta elegans* também fora documentada. Sobrinho *et al.* (2017) isolaram três espécies bacterianas em seu estudo com tartarugas *T. scripta elegans*, também mantidas em cativeiro, em um município de Pernambuco, Brasil, e obtiveram resultado similar ao obtido neste trabalho em relação a espécie *E. tarda*, onde fora isolada em 5% das 20 amostras, ao todo.

*Klebsiella sp.* tem sido associada a abscessos da glândula secretora de sal e da parede peritoneal, broncopneumonia, lesões integumentares, rinite obstrutiva, dermatite ulcerativa

traumática, doença da concha ulcerativa e estomatite ulcerativa em tartarugas marinhas de cativeiro e selvagens (Santoro *et al.* 2006). Ahmed *et al.* (2007) isolaram *Klebsiella oxytoca* em diversos animais mantidos em zoológico, dentre eles tartarugas, cobras e lagartos. Ainda não se tem conhecimento do impacto e do papel dessa bactéria em populações do gênero *Trachemys*, embora já tenha sido isolada anteriormente por Santos *et al.* (2011). A baixa ocorrência de *C. freundii* e *K. oxytoca* é um resultado similar ao que fora obtido por Santos *et al.* (2011) para a espécie *T. scripta elegans*.

*Proteus hauseri* é um bacilo Gram-negativo, bem difundido no ambiente e no trato gastrointestinal de humanos e animais (Pathirana *et al.* 2017). *Proteus hauseri* teve uma grande abundância, no entanto, deve-se levar em consideração a metodologia utilizada e a forma de crescimento dessa bactéria, bem como sua morfologia. Seu crescimento em meio de cultura é dominante sobre outras colônias bacterianas, caracterizado pelo desenvolvimento de anéis concêntricos que são formados a partir da diferenciação celular (Belas *et al.* 1998). Em tartarugas marinhas *Proteus* spp. tem sido relacionado como a causa de enterite fibrinosa e necrosante, broncopneumonia exudativa, pneumonia granulomatosa, hepatite granulomatosa e/ou necrosante, nefrite granulomatosa e abscessos renais (Orós *et al.* 2005). Chiacchio *et al.* (2014) e Di Ianni *et al.* (2015) também isolaram *Proteus* spp. em tartarugas-de-orelha-vermelha, no entanto ainda não se tem conhecimento sobre o impacto desse microrganismo na saúde das tartarugas. Pathirana *et al.* (2017) identificaram a prevalência de genes de virulência em tartarugas criadas como *pet*, e uma alta similaridade entre a sequência do gene *mrpA* dos isolados de *Proteus* spp. provenientes das tartarugas domésticas e de humanos. Este gene é responsável por diversos fatores de virulência da bactéria, como a capacidade de aderência ao tecido epitelial, formação de biofilme, e ao fenômeno *swarming* – caracterizado pela capacidade de se espalhar sobre a superfície (Pathirana *et al.* 2017). Portanto, as tartarugas criadas como *pet* poderiam ser transmissoras do patógenos para os humanos, aumentando assim o risco de infecções urinárias e respiratórias.

Em seu trabalho sobre a colonização de Enterobacteriaceae presente na cloaca de tartarugas *T. scripta elegans*, Chiacchio (2014) isolou *Escherichia coli* em poucas amostras, resultado similar ao que fora obtido no presente trabalho. Por ser um componente comum da microbiota bacteriana do intestino de répteis, *E. coli* não pode ser interpretada como um patógeno (Rangel-Mendoza *et al.* 2014), para tal são necessárias análises adicionais com a finalidade de determinar o sorotipo da população de *E. coli* presente no ambiente do CECLIMAR, local em que fora isolada.

*Aeromonas hydrophila* é uma bactéria Gram-negativa que ocorre naturalmente em ambiente aquático, principalmente por ser um componente da microbiota de peixes, répteis e anfíbios. Frequentemente tem sido indicada como agente etiológico de doenças locais e sistêmicas em répteis e peixes (Son *et al.* 1997), e tem sido isolada de tartarugas de água doce com sinais clínicos de anorexia e septicemia (Soccini & Ferri, 2004), porém ainda não fora particularmente relacionada a alguma patogenicidade (Fichi *et al.* 2016). Assim como no presente trabalho, Soccini & Ferri (2004) também isolaram *A. hydrophila* da cloaca de tartarugas-de-orelha-vermelha (*T. scripta elegans*), no entanto ainda não havia sido registrada a presença de *Aeromonas* spp. em tartarugas-tigre-d'água (*T. dorbigni*), sendo o presente trabalho o primeiro a realizar este registro na literatura.

*Yersinia frederiksenii* é uma bactéria Gram-negativa, comum do trato gastrointestinal de répteis e raramente está associada a alguma infecção nesses animais, ao contrário de outras espécies desse gênero, como *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* (Carvalho *et al.* 2013). Assim como no presente trabalho, Nowakiewicz *et al.* (2015) e Soccini & Ferri (2004) também tiveram poucos isolados de *Yersinia* spp. em tartarugas *Emys orbicularis* e *T. scripta elegans*, respectivamente. Carvalho *et al.* (2013) observaram a presença de *Y. frederiksenii* em amostras cloacais de lagarto Teiú (*Tupinambis merianae*).

*Shewanella putrefaciens* é uma bactéria pleomórfica, Gram-negativa, aeróbia facultativa, com ampla distribuição no ambiente e tem sido isolada de ambientes aquáticos, sedimentos e campos de petróleo (Vogel *et al.* 1997). De acordo com o mesmo estudo, essa bactéria é capaz de reduzir metabolicamente muitos aceptores de elétrons, tais como ferro, manganês, nitrato, nitrito, óxido N-trimetilamina, entre outros, utilizando-os na cadeia de transporte de elétrons ao invés de utilizar oxigênio como os demais aeróbios obrigatórios. Devido a essa versatilidade metabólica, bem como sua grande abundância em ambientes marinhos, *S. putrefaciens* aparentemente possui um importante papel na transformação de matéria orgânica em ambientes salinos. Em relação a humanos, esse microrganismo tem sido isolado de fezes, urina, úlceras de pele, infecções de ouvido, diálises peritoneais, infecções intra-abdominais e bacteremia (Vogel *et al.* 1997). Heinol *et al.* (2015) isolaram *S. putrefaciens* a partir de suabes orais de tartarugas *Sternotherus odoratus* e *Pelusios castaneus*, mantidas em cativeiro, sendo uma das bactérias mais abundantes nas tartarugas analisadas. Analisando a microbiota cloacal de tartarugas-cabeçudas (*Caretta caretta*) pré e pós tratamento com oxitetraciclina, Kelly *et al.* (2006) verificaram que os isolados de *S. putrefaciens* apresentavam resistência ao antibiótico após uma semana de tratamento, no

entanto, um mês depois a bactéria não fora isolada novamente, indicando que oxitetraciclina tem o potencial de alterar a microbiota cloacal de *C. caretta*. Fichi *et al.* (2016) também isolaram *S. putrefaciens* de 2 tartarugas-cabeçudas, no entanto, de amostras de órgãos e vísceras – bexiga, pulmão e cérebro – pós-óbito dos indivíduos, que foram encontrados encalhados e já sem vida na costa da Toscana, Itália. Embora seja uma espécie bacteriana que já fora isolada em quelônios, ainda não se tem conhecimento sobre o potencial patogênico dessa bactéria nesse grupo de animais, sendo este trabalho possivelmente o primeiro a registrar a presença desse microrganismo em tartarugas *T. dobigni*.

Bactérias do gênero *Enterobacter* são Gram-negativas, possuem cinco flagelos polares que auxiliam na motilidade e estão presentes no trato gastrointestinal de humanos e outros animais, bem como no solo, na água, em plantas e também em insetos (Santos *et al.* 2015). Em humanos tem sido associada a infecções respiratórias, de pele, do trato urinário, do sistema nervoso central e do trato gastrointestinal (Santos *et al.* 2015). Estão relacionadas a diversas doenças em répteis, tais como estomatite, cloacite, infecções de ouvido, abscessos viscerais e subcutâneos, infecções do trato respiratório superior e pneumonia (Ebani & Fratini, 2005). Santoro *et al.* (2006) isolaram *Enterobacter agglomerans* de amostras de tartarugas-verde (*Chelonia mydas*) e associaram a abscessos na glândula secretora de sal e na parede peritoneal, broncopneumonia, rinite obstrutiva, dermatite ulcerativa, estomatite ulcerativa, entre outras doenças.

*Plesiomonas shigelloides* é um bacilo Gram-negativo, móvel, é incapaz de produzir cápsula ou esporos, apresenta tolerância em ambientes alcalino e ácido, bem como também apresenta um grau relativamente alto de halotolerância (Stock, 2004). Devido a isso, podem ser encontradas primeiramente em ambientes de água doce, assim como em águas salobras ou estuarinas e também em ambientes marinhos, estes, no entanto em menor abundância (Janda *et al.* 2016). Desde 2000 já há registros da ocorrência de *P. shigelloides* em répteis, como jacarés e lagartos (Janda *et al.* 2016). Recentemente foi associada à microbiota oral e cloacal de quelônios, como *Emys orbiculata* e *Mauremys rivulata*, ambos provenientes de um lago do Mediterrâneo (Hacioglu & Tosunoglu, 2014).

*Staphylococcus haemolyticus* foi uma das poucas bactérias Gram-positivas isoladas entre as tartarugas de ambos locais de coleta. É um microrganismo pertencente ao grupo dos estafilococos coagulase-negativos (CNS, *coagulase-negative staphylococci*), os quais são os principais componentes da microbiota natural da pele humana, e também são considerados

como saprófitos (Di Ianni *et al.* 2015). *Staphylococcus haemolyticus* já fora isolado em outras espécies de répteis. Pessoa (2009) isolou estafilococos em 29% das 100 amostras de suabes de cloaca de jabutis-piranga (*Geochelone carbonaria*), e no trabalho de Santoro *et al.* (2006) *Staphylococcus* spp. foi isolado em 73,2% dos 70 suabes cloacais de tartarugas-verde (*Chelonia mydas*). Do ponto de vista patogênico, *Staphylococcus* spp. tem sido associado a broncopneumonia exudativa, pneumonia granulomatosa, nefrite granulomatosa, hepatite granulomatosa e/ou necrosante e abscessos renais em tartarugas marinhas (Orós *et al.* 2005). Contudo, os estudos para a ocorrência dessa espécie em tartarugas do gênero *Trachemys* ainda são escassos, sendo o presente trabalho, provavelmente o primeiro na literatura a identificar *S. haemolyticus* na subespécie *T. scripta elegans*. Para determinar a patogenicidade desse microrganismo nas tartarugas terrestres – como a tartaruga-de-orelha-vermelha e tartaruga-tigre-d'água – são necessários mais estudos.

*Enterococcus* spp. são bactérias Gram-positivas, comumente encontradas no trato gastrointestinal de humanos e animais, tais como mamíferos, répteis e aves (Lebreton *et al.* 2014) A presença de *Enterococcus* spp. já havia sido identificada em outras espécies de tartarugas. Haserback *et al.* (2011) isolaram *Enterococcus* spp. de amostras fecais de tartaruga-mordedora (*Chelydra serpentina*). Pereira (2016) isolou diversas espécies de enterococos em amostras fecais de tartarugas-verde (*Chelonia mydas*) e tartarugas-de-pente (*Eretmochelys imbricata*), dentre elas *E. faecalis* e *E. casseliflavus*, ambas também isoladas nas tartarugas analisadas no presente trabalho. Ao contrário do que foi obtido neste trabalho, *E. faecalis* foi um dos microrganismos mais abundantes no trabalho de Nowakiewicz *et al.* (2015), onde analisaram a microbiota cloacal de cagados-de-carapaça-estriada que viviam em cativeiro e em seu ambiente natural.

### ***Suscetibilidade antimicrobiana***

Em relação à suscetibilidade aos antimicrobianos, foram submetidos a testes de disco de difusão um total de 45 isolados, sendo 22 isolados de *T. dorbigni* e 23 isolados de *T. scripta elegans*, todos oriundos do Parque Zoológico (Tabela 3). Ao todo 13 isolados apresentaram algum tipo de resistência aos antimicrobianos testados, cinco provenientes de tartarugas *T. dorbigni* e oito provenientes de tartarugas *T. scripta elegans*. Os demais isolados bacterianos submetidos ao teste apresentaram suscetibilidade a todos antimicrobianos. O teste de suscetibilidade aos antimicrobianos dos demais isolados será realizado em breve.

**Tabela 3.** Resistência bacteriana dos isolados oriundos do Parque Zoológico de Sapucaia, demonstrando resistência plena (R) e resistência intermediária (I).

| Espécie              | Indivíduo <sup>a</sup> | Bactéria                             | Antibióticos <sup>b</sup> |    |     |     |     |     |     |
|----------------------|------------------------|--------------------------------------|---------------------------|----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                      |                        |                                      | ASB                       | AM | CFO | CIP | EST | GEN | TET |
| <i>T. dorbigni</i>   | A                      | <i>Citrobacter freundii</i>          |                           |    | R   |     |     |     |     |
| <i>T. dorbigni</i>   | A                      | <i>Citrobacter freundii</i>          |                           |    | R   |     |     |     |     |
| <i>T. dorbigni</i>   | A                      | <i>Citrobacter freundii</i>          |                           |    | I   |     |     |     |     |
| <i>T. dorbigni</i>   | A                      | <i>Hafnia alvei</i>                  | I                         |    |     |     |     |     |     |
| <i>T. dorbigni</i>   | B                      | <i>Citrobacter freundii</i>          |                           |    | R   |     |     |     |     |
| <i>T. s. elegans</i> | C                      | <i>Morganella morganii</i>           |                           |    |     |     |     |     | I   |
| <i>T. s. elegans</i> | D                      | <i>Morganella morganii</i>           |                           |    | I   |     | I   |     |     |
| <i>T. s. elegans</i> | D                      | <i>Edwardsiella tarda</i>            | I                         |    | I   |     |     |     |     |
| <i>T. s. elegans</i> | D                      | <i>Hafnia alvei</i>                  | I                         |    |     |     |     |     |     |
| <i>T. s. elegans</i> | D                      | <i>Edwardsiella tarda</i>            |                           |    |     |     | I   |     |     |
| <i>T. s. elegans</i> | E                      | <i>Raoultella ornithinolytica</i>    |                           |    |     |     | I   |     |     |
| <i>T. s. elegans</i> | E                      | <i>Staphylococcus haemolyticus</i>   |                           | R  | R   |     |     |     |     |
| <i>T. s. elegans</i> | E                      | coco Gram-negativo/catalase negativo | R                         | R  | I   |     |     | I   | I   |

a: Letras iguais indicam que os isolados foram obtidos a partir da mesma tartaruga.

b: Antimicrobianos: Ampicilina-Sulbactam (ASB), Amicacina (AMI), Cefoxitina (CFO), Ciprofloxacina (CIP), Estreptomicina (EST), Gentamicina (GEN) e Tetraciclina (TET).

A maioria dos isolados apresentou perfil de resistência à Cefoxitina (8/13), dentre eles, cinco foram resistentes ao antibiótico, e os demais demonstraram resistência intermediária. Duas espécies bacterianas demonstraram resistência à Cefoxitina, *Citrobacter freundii* e *Staphylococcus haemolyticus*, além de um isolado cuja espécie não foi identificada.

O isolado de espécie desconhecida – um coco Gram-negativo e catalase negativo – foi o único que apresentou resistência a mais de dois antibióticos testados, embora resistência intermediária também tenha sido verificada. A bactéria foi resistente à Amicacina e à Cefoxitina, e apresentou resistência intermediária à Ciprofloxacina, Gentamicina e à Tetraciclina. Esse dado indica que a bactéria em questão pode ser considerada como multi-resistente, e serve de motivação para seguir com o objetivo de determinar as espécies que não foram identificadas pelo Maldi-TOF.

A resistência de *C. freundii* às cefalosporinas já havia sido documentada por Foti *et al.* (2009), no entanto, em seu trabalho a bactéria foi isolada de tartarugas-cabeçudas (*Caretta caretta*) e fora utilizado Cefalotina, uma cefalosporina de primeira geração, ao invés de Cefoxitina - cefalosporina de segunda geração.

Os dois isolados de *E. tarda* analisados demonstraram resistência intermediária a alguns antimicrobianos. A resistência intermediária à Cefoxitina demonstrada por um isolado de *E. tarda* foi um resultado similar ao obtido por Shin *et al.* (2017), onde fora verificado a susceptibilidade a antimicrobianos de isolados oriundos de diversas tartarugas domésticas, dentre elas *T. scripta scripta*. Também fora verificado nos isolados de *E. tarda* um perfil de resistência intermediária apresentada pelos mesmos para os antibióticos Ampicilina-Sulbactam e Estreptomicina. No entanto, ainda não há na literatura dados similares aos obtidos em nosso trabalho.

### ***Isolamento de Enterococcus***

Das amostras do Parque Zoológico foram obtidos 20 isolados com características fenotípicas e bioquímicas de *Enterococcus* spp., sendo 10 oriundos de uma tartaruga *T. dorbigni* e 20 oriundos de uma tartaruga *T. scripta elegans*. Um total de 20 isolados a partir das amostras obtidas no CERAM/CECLIMAR foram obtidos, sendo 10 isolados de cada espécie. Todos foram submetidos à identificação através do Maldi-TOF, no entanto, só fora possível determinar em nível de gênero, o qual foi confirmado como *Enterococcus*. Esses isolados ainda não puderam ser submetidos à confirmação em nível de espécie através de PCR devido à falta de tempo para a análise dos dados e redação do presente trabalho.

O isolamento dos prováveis enterococos só foi possível após alterarmos a concentração de Cloreto de Sódio (NaCl) presente no meio de cultura, de 6,5% para 3,5%, diminuindo assim, a pressão seletiva sobre os microrganismos. Contudo essa alteração na metodologia só ocorreu durante o isolamento dos dois últimos suabes provenientes do PZS, e, portanto, das 8 amostras anteriormente analisadas, que não apresentaram crescimento em meio de cultura com 6,5% de NaCl, talvez também pudesse ser observado crescimento bacteriano caso a concentração de sal fosse menor. A confirmação da presença de bactérias do gênero *Enterococcus* nessas amostras será realizada a partir de PCR empregando oligonucleotídeos espécie específica.

A fim de cumprir o prazo estabelecido para a entrega do presente trabalho, não foi possível realizar os experimentos para isolamento de *Enterococcus* spp. nas amostras provenientes do CERAM/Ceclimar. Toda via, 500 µL do Caldo Azida Dextrose que apresentou turbidez após a adição da água peptonada (vide Material e Métodos) fora armazenado em microtubos eppendorfs contendo 500 µL de glicerol, para posteriormente dar continuidade no isolamento.

A resistência observada para crescer em meios hipersalinos não é uma característica comum dos enterococos já identificados na literatura, visto que de acordo com Pereira (2016), são microrganismos tolerantes a variações de pH e temperatura, sendo capazes de se adaptarem as mais diversas condições ambientais. O resultado observado nos indica que há a possibilidade de termos isolado nas tartarugas *Trachemys* sp. uma nova espécie de enterococos, uma vez que em amostras de ambas espécies de tartarugas oriundas do CERAM/Ceclimar, fora observada a presença de isolados do gênero *Enterococcus*, os quais foram capazes de crescer em meio de cultura sem qualquer seletividade para esses microrganismos. A confirmação de espécie por PCR, bem como o seqüenciamento do DNA total irão determinar se nossa hipótese está realmente correta.

#### 4. CONCLUSÃO

As tartarugas exóticas, *T. scripta elegans* apresentaram uma maior diversidade bacteriana do que as tartarugas nativas *T. dorbigni*. Esse dado sustenta a hipótese de que espécies exóticas realmente são capazes de introduzir novos microrganismos em locais onde as mesmas são introduzidas, seja de maneira direta ou indireta através do ser humano.

A alta abundância de *C. freundii* nas amostras de tartarugas-tigre-d'água (*T. dorbigni*) indica que estas, quando em situações de estresse, tendem a ser mais suscetíveis a desenvolverem a SCUD, em relação às tartarugas-de-orelha-vermelha (*T. scripta elegans*). O fato dos isolados de *C. freundii* terem apresentado resistência a antibióticos é um fator que deve ser considerado para determinar o potencial zoonótico da cepa bacteriana presente nessa população de tartarugas presente do Parque Zoológico.

O perfil de resistência dos isolados de *C. freundii* e *E. tarda* para antimicrobianos da classe cefalosporina está de acordo com o que consta na literatura para outras espécies de quelônios, e indica que caso essas cepas sejam capazes de causar alguma doença nos quelônios, as tartarugas portadoras desses microrganismos podem representar um grande

risco de propagar patologias para as demais tartarugas do ambiente, bem como para outras espécies de animais, e até mesmo para humanos. No entanto, são necessários mais estudos para afirmar que de fato é o contato com o ser humano que influenciou a aquisição do perfil de resistência desses microrganismos.

A alta abundância da bactéria *Hafnia alvei* em amostras de ambas tartarugas está de acordo com o que fora obtido em outros estudos que analisaram a microbiota desses indivíduos, indicando que são um componente natural da microbiota de tartarugas do gênero *Trachemys*. No entanto, são necessárias mais análises para verificar se esses microrganismos podem apresentar algum risco de patogenicidade para as tartarugas.

A baixa abundância observada de *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Yersinia frederiksenii* está de acordo com o que fora observado em outros trabalhos na literatura para diferentes espécies de quelônios. No entanto, este foi o primeiro a isolar *Staphylococcus haemolyticus* e *Plesiomonas shigelloides* de tartarugas *T. scripta elegans*.

O presente trabalho também foi o primeiro a registrar a presença de *Aeromonas* spp. *Enterococcus faecalis*, e *Shewanella putrefaciens* em tartarugas tigre-d'água, embora esses microrganismos sejam considerados como componentes naturais da microbiota de répteis. Ainda que haja diversos trabalhos a respeito de fatores ecológicos de *T. dorbigni*, até então são escassos os que analisam a microbiota desses indivíduos.

É de suma importância obter conhecimento da microbiota presente nas tartarugas-tigre-d'água, visto que são espécies nativas do Rio Grande do Sul e estão sob constantes ameaças ecológicas, e, portanto, os nossos dados acrescentam informações fundamentais para a literatura dessa espécie.

Nossos resultados também sustentam a hipótese de que as tartarugas podem ser consideradas como agentes etiológicos de patógenos oportunistas prejudiciais aos humanos quando criadas como *pet*. Portanto é recomendado mantê-los longe de locais de alimentação e preparo de alimento, como por exemplo, cozinhas, e manter o animal sob condições adequadas de higiene.

Além disso, répteis aparentemente saudáveis podem ser portadores de patógenos oportunistas causadores de doenças em outros animais, como cães, gatos, e demais mamíferos. Devido a isso, o comércio ilegal de tartarugas exóticas – como a tartaruga-de-

ouvido-vermelho – assim como a introdução em diferentes habitats, não são recomendados, visto que na maioria das vezes a origem do animal é desconhecida, e o mesmo pode ser responsável pela introdução de novas cepas bacterianas no ambiente.

## **5. AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha família como um todo, principalmente aos meus pais e ao meu irmão por todo amor, apoio emocional e incentivo durante todos esses anos, vocês são meu porto seguro. Ao Gabriel Matte, meu muito obrigada por toda dedicação, paciência e companheirismo para comigo ao longo dessa jornada, teu apoio foi muito essencial.

A minha orientadora, Ana Paula Guedes Frazzon, agradeço de coração por ter abraçado a idéia do projeto desde o início, e por ter estado sempre presente disponibilizando seu tempo e compartilhando seu vasto conhecimento. Ao meu co-orientador, Márcio Borges Martins, obrigada por todo auxílio em campo e por todas as dicas e ensinamentos compartilhados. A todos do Laboratório 222-C, obrigada pelo acolhimento e ajuda durante a realização do projeto, e agradeço principalmente a Rosana Huff, a Tiela Trapp e ao Alberto Araújo por diversas vezes terem-se feitos essenciais para o sucesso deste trabalho.

A todos meus colegas de trabalho do CREAL, muito obrigada por sempre compreenderem minha correria diária, e à Fernanda Mello, obrigada especial por ser além de chefe, uma grande amiga, a qual sempre me amparou e incentivou muito. Aos meus amigos, obrigada por compreenderem minha falta de tempo durante a execução deste trabalho e por ficarem contentes por mais uma conquista.

Muito obrigada à equipe de biólogos e médicos voluntários do Parque Zoológico por terem autorizado a realização da coleta dos suabes cloacais, principalmente a bióloga Vanessa, que nos recebeu e auxiliou tanto durante a coleta. Obrigada ao Derek Blaese e aos demais voluntários do CERAM, no Ceclimar, que foram tão solícitos para conosco, disponibilizando seu tempo para nos auxiliar durante a captura das tartarugas.

## 6. REFERÊNCIAS

AHMED, A., MOTOI, Y., SATO, M., MARUYAMA, A., WATANABE, H., FUKOMOTO, Y., SHIMAMOTO, T., 2007. **Zoo Animals as Reservoirs of Gram-Negative Bacteria Harboring Integrons and Antimicrobial Resistance Genes.** *Applied and Environmental Microbiology*, v.73(20), p. 6686-6690.

BELAS, R., SCHNEIDER, R., MELCH, M., 1998. **Characterization of *Proteus mirabilis* precocious swarming mutants: identification of *rsbA*, encoding a regulator of swarming behavior.** *Journal of Bacteriology*, v.180(23), p. 6126-6139.

BUJES, C., MOLINA, F., VERRASTRO, L., 2011. **Population characteristics of *Trachemys dorbigni* (Testudines, Emydidae) from Delta do Jacuí State Park, Rio Grande do Sul, Southern Brazil.** *South American Journal of Herpetology*, v.6(1), p. 27-34.

CARVALHO, A., JÚNIOR, A., ANDRADE, M., JAYME, V., 2013. **Prevalence of Enterobacteriaceae in *Tupinambis merianae* (Squamata: Teiidae) from a captive facility in Central Brazil, with a profile of antimicrobial drug resistance in *Salmonella enterica*.** *Phyllomedusa*, v.12(1), p.57-67.

**CERAM.** Fonte: Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinheiros. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/ceclimar/ceram>>; Acesso em: 25 de maio de 2018.

CHIACCHIO, R., PENIDO JUNIOR, G., SOUZA, C., PRIOSTE, F., PRADO, M., KNÖBL, T., MENÃO, M., MATUSHIMA, E., 2014. **Enterobacterial colonization in captive red-eared sliders (*Trachemys scripta elegans*).** *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v.45(4), p. 919-921.

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

COLSTON, T. AND JACKSON, C., 2016. **Microbiome evolution along divergent branches of the vertebrate tree of life: what is known and unknown.** *Molecular Ecology*, v.25, p. 3776-3800.

COUTINHO, M. 2002. **Introdução de Espécies Exóticas: o caso *Trachemys scripta elegans***. Monografia (Graduação), Centro Universitário de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, 24f.

DI IANNI, F., DODI, P., CABASSI, C., PELIZZONE, I., SALA, A., CAVIRANI, S., PARMIGIANI, E., QUINTAVALLA, F., TADDEI, S., 2015. **Conjunctival flora of clinically normal and diseased turtles and tortoises.***BCM Veterinary Research*, v.91(11), p. 1-9.

DONATO, S., SIDRIM, J. 2007. **Comparação de métodos convencionais e semi-automatizados 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.

DOS SANTOS, G., SOLIDÔNIO, E., COSTA, M., MELO, R., DE SOUZA, I., SILVA, G., SENA, K., 2015. **Study of the Enterobacteriaceae Group CESP (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Providencia*, *Morganella* and *Hafnia*): A Review.** In: *The Battle, Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*. Formatex.

EBANI, V., FRATINI, F., 2005. **Bacterial zoonoses among domestic reptiles.** *Annali Fac. Med. Vet.*, LVIII, p. 85-91.

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.** *Veterinary Microbiology*, v.185, p. 56-61.

FIGUEIREDO, P., 2014. **Verificação da ocorrência de hibridação entre Tartaruga-tigre-d'água, *Trachemys dorbigni* e Tartaruga-americana, *Trachemys scripta* (Testudines, Emydidae).** Monografia (Graduação) – UERGS em parceria com UFRGS, Instituto de Biociências, 33 f.

FOTI, M., GIACOPELLO, C., BOTTARI, T., FISICHELLA, V., RINALDO, D., MAMMINA, C., 2009. **Antibiotic resistance of Gram Negative isolates from loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) in the central Mediterranean Sea.***Marine Pollution Bulletin*, v.58, p. 1363-1366.

GOODRICH, J., DAVENPORT, E., WATERS, J., CLARK, A., LEY, R., 2016. **Cross-species comparisons of host genetic associations with the microbiome.** *Science*, v.352, p. 535-535.

HACIOGLU, N.2014. **Determination of antimicrobial and heavy metal resistance profiles of some bacteria isolated from aquatic amphibian and reptile species.** *Environ Monit Assess*, v.186, p. 407-413.

HABERSACK, M., DILLAHA, T., HAGEDORN, C., 2011. **Common snapping turtles (*Chelydra serpentina*) as a source of fecal indicator bacteria in freshwater systems.** *Journal of the American water resources association*, v.47(6); p. 1255-1260.

HEYOL, V., HECKERS, K., BEHNCKE, H., HEUSINGER, A., MARSCHANG, R., 2015. **Detection of Bacteria in Oral Swabs from Healthy Common Musk Turtles (*Sternotherus odoratus*) and West African Mud Turtles (*Pelusioscastaneus*).** *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, v. 25(1), p. 33-39.

HOSSAIN, S., WIMALASENA, S., HEO, G., 2017. **Virulence Factors and Antimicrobial Resistance Pattern of *Citrobacter freundii* Isolated from Healthy Pet Turtles and their Environment.***Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, v.12, p. 10-16.

HUFF, R., 2016. **Diversidade e perfil antimicrobiano de *Enterococcus* spp. Isolados de fezes de imaturos de *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera – Nymphalidae).** Monografia (Graduação), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, 33f.

JACOBSON E.R. 2007. **Bacterial diseases of reptiles**, p.461-527. In: Jacobson E.R. (Ed.), **Infectious diseases and pathology of reptiles: color atlas and text.** CRC Press, Boca Raton, USA.

JANDA, J., ABBOTT, S., McIVER, C., 2016. ***Plesiomonas shigelloides* Revisited.** *Clinical Microbiology Reviews*, v.29(2), p. 349-374.

KELLY, T., HARMS, C., LEMONS, C., McLELLAN, C., HOHN, A., 2006. **Influence of Preoperative Oxytetracycline Administration on Community Composition and Antimicrobial Susceptibility of Cloacal Bacterial Flora of Loggerhead Sea Turtle,**

***Carettacaretta*, Post-Hatchlings.** *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, v. 16(1), p. 9-14.

LEBRETON, F., WILLEMS, R., GILMORE, M., 2014. ***Enterococcus* Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization.** In: GILMORE M. S. (Ed.), *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary.

MARSH, P., GORBACH, S., 1982. **Invasive enterocolitis caused by *Edwardsiella tarda*.** *Gastroenterology*, v.82(2) p.336-338.

MORENO, C., 2009. ***Hafnia alvei*.** *Rev. Chil Infect*, v.26(4), p. 355.

NOWAKIEWICZ, A., ZIOŁKOWSKA, G., ZIEBA, P., DZIEDZIC, B., GNAT, S., WOJCIK, 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*, v.51(1), p. 255-259.

OKADA, S., GORDON, D., 2003. **Genetic and Ecological Structure of *Hafnia alvei* in Australia.** *System. Appl. Microbiol.*, v.26, p. 585-594.

ORÓS, J., TORRENT, A., CALABUIG, P., DÉNIZ, S., 2005. **Diseases and causes of mortality among sea turtles stranded in the Canary Islands, Spain (1998-2001).** *Diseases of Aquatic Organisms*, v.63, p. 13-24.

PADILLA, D., ACOSTA, F., RAMOS-VINAS, J., GRASSO, V., BRAVO, J., AAMRI, F., REAL, F., 2014. **The pathogen *Hafnia alvei* in veterinary medicine: a review.** *Journal of Applied Animal Research*, v. 43(2), p. 231-235.

**PARQUE ZOOLOGICO** (2012). Fonte: Fundação Zoobotânica do RS. Disponível em: [http://www.zoo.fzb.rs.gov.br/conteudo/548/?Parque\\_Zool%C3%B3gico\\_-\\_Apresenta%C3%A7%C3%A3o](http://www.zoo.fzb.rs.gov.br/conteudo/548/?Parque_Zool%C3%B3gico_-_Apresenta%C3%A7%C3%A3o)

PATHIRANA, H., DE SILVA, B., WIMALASENA, S., HOSSAIN, S., HEO, G., 2017. **Comparison of virulence genes in *Proteus* species isolated from human and pet turtle.** *Iranian Journal of Veterinary Research*, v.19(1), p. 48-52.

PEREIRA, R., 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)*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, 154 f.

PESSOA, C., 2009. **Avaliação da microbiota bacteriana e fúngica presente na cloaca de jabutis (*Geochelone carbonária*) criados em domicílio e análise do potencial risco à saúde humana.** *Dissertação (Mestrado)*, Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 96f.

PRICHULA, J., PEREIRA, R., WACHHOLZ, G., CARDOSO, L., TOLFO, N., SANTESTEVAN, N., MEDEIROS, A., TAVARES, M., FRAZZON, J., D'AZEVEDO, P., FRAZZON, A., 2016. **Resistance to antimicrobial agents among enterococci isolated from fecal samples of wild marine species in the Southern coast of Brazil.** *Marine Pollution Bulletin*, p.51-57.

RANGEL-MENDOZA, J., SÁNCHEZ-GONZÁLES, I., LÓPEZ-LUNA, M., WEBER, M., 2014. **Health and Aquatic Environment Assessment of Captive Central American River Turtles, *Dermatemys mawii*, at Two Farms in Tabasco, México.** *Chelonian Conservation and Biology*, v.13(1), p. 96-109.

ROSSI, S., LOVATO, E., HÖFLING, J., 2006. **Aspectos biológicos da Tartaruga-de-orelha-vermelha, *Trachemys scriptaelegans* (Reptilia, Testudines, Emydidae), em cativeiro.** *Bioikos*, v.20(1), p. 33-40.

SANTORO, M., HERNÁNDEZ, G., CABALLERO, M., GARCÍA, F., 2006. **Aerobic bacterial flora of nesting Green Turtles (*Cheloniamydas*) from Tortuguero National Park, Costa Rica.** *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v.37(4), p. 549-552.

SANTOS, K., PETRI, B., MILANEIO, L., FITORRA, L., 2011. **Avaliação da microbiota bacteriana cloacal de *Trachemys scriptaelegans*, recebidos no CRAS, Parque Ecológico do Tietê, SP.** *Revista Científica de Medicina Veterinária*, v.9 (31), p. 650-652.

SENG, P., BOUSHAB, B., ROMAIN, F., GOURIET, F., BRUDER, N., MARTIN, C., PAGANELLI, F., BERNIT, E., LE TREUT, Y., THOMAS, P., PAPA ZIAN, L., RAOULT, D., STEIN, A., 2016. **Emerging role of *Raoultella ornithinolytica* in human infections: a series of cases and review of the literature.** *Internacional Journal of Infectious Diseases*, v.45, p. 65-71.

SHIN, DM., HOSSAIN, S., WIMALASENA, S., HEO, G., 2017. **Antimicrobial resistance and virulence factors of *Edwardsiella* isolated from pet turtles.** *Pak Vet J.*, v.37(1), p. 85-89.

SOBRINHO, F., De SÁ, M., GOUVEIA, G., COSTA, M., De FARIA, M., MILANELO, L., GRADELA, A., 2017. **Isolamento e determinação de sensibilidade e resistência a antimicrobianos de cepas bacterianas presentes na cloaca de *Trachemys scripta elegans* (Wied, 1839) criadas em cativeiro em Petrolina, PE.** *Pesq. Vet. Bras.*, v.37(3), p. 261-268.

SOCCINI, C., FERRI, V., 2014. **Bacteriological screening of *Trachemys scripta elegans* and *Emys orbicularis* in the Po plain (Italy).** *Biologia, Bratislava*, v.59(14), p. 201-207.

SON, R., RUSUL, G., SAHILAH, A., ZAINURI, A., RAHA, A., SALMAH, I., 1997. **Antibiotic resistance and plasmid profile of *Aeromonas hydrophila* isolates from cultured fish, *Telapia* (*Telapia mossambica*).** *Letters in Applied Microbiology*, v.24, p. 479-482.

STOCK, I., 2004. ***Plesiomonas shigelloides*: an emerging pathogen with unusual properties.** *Reviews in Medical Microbiology*, v.15, p. 129-139.

VOGEL, B., JORGENSEN, K., CHRISTENSEN, H., OLSEN, J., GRAM, L., 1997. **Differentiation of *Shewanella putrefaciens* and *Shewanella alga* on the Basis of Whole-Cell Protein Profiles, Ribotyping, Phenotypic Characterization, and 16S rRNA Gene Sequence Analysis.** *Applied and Environmental Microbiology*, v.63, p. 2189-2199.

WIMALASENA, S., SHIN, G., PATHIRANA, H., DE SILVA, B., HOSSAIN, S., HEO, G., 2017. **Characterization of quinolone resistant determinants in *Morganella morganii* isolated from pet turtles.** *Asian J. Anim. Vet. Adv.*, v.12, p. 189-196.

YUAN, M., DEAN, S., LONGO, A., ROTHERMEL, B., TUBERVILLE, T., ZAMUDIO, K., 2015. **Kinship, inbreeding, and fine-scale spatial structure influence gut microbiota in a hindgut-fermenting tortoise.** *Molecular Ecology*, v.24, p. 2521-2536.