



## ESTUDO DA MICROBIOTA BACTERIANA DE CTENUS AMPHORA

Samara Moreira Barbosa<sup>1</sup>, Thierry Ray Jehlen Gasnier<sup>1</sup>, Takeshi Matsura<sup>1</sup>, and Janeide Alexandre Dantas<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pesquisadores junto a Universidade Federal do Amazonas.

<sup>2</sup>Pesquisadora junta a Universidade Federal do Pará.



### RESUMO

O estudo sobre a microbiota de espécies selvagens presentes em áreas urbanas fornece dados sobre a riqueza de microrganismos que podem ser considerados normais no hospedeiro e a relevância destas bactérias tanto para esses animais quanto para a sociedade. O conhecimento da microbiota que compõe as diferentes áreas de *Ctenus amphora*, é inexistente. Foi com o objetivo de determinar as bactérias que compõem esta aranha errante que foram coletados 20 indivíduos dos quais obteve-se amostras do exoesqueleto e do canal retal. A partir de análises morfológicas e bioquímicas constatou-se que a maioria das colônias isoladas são bastonetes gram positivos com predominância do gênero *Bacillus* spp. e que a frequência das bactérias na superfície externa e interna, no aracnídeo investigado, foram semelhantes.

**Palavras – Chave:** Microbiota, bactéria, *Ctenus amphora*.

### STUDY OF BACTERIAL MICROBIOTE OF CTENUS AMPHORA

The study on the microbiota of wild species present in urban areas provides data on the richness of microorganisms that can be considered normal in the host and the relevance of these bacteria for both animals and society. The knowledge of the microbiota that makes up the different areas of *Ctenus amphora* is non-existent. It was aimed to determine the bacteria that make up this wandering spider that collected 20 individuals from whom exoskeleton and rectal canal samples were obtained. From the morphological and biochemical analyzes it was verified that the majority of the isolated colonies are gram positive rods with predominance of the genus *Bacillus* spp. and that the frequency of the bacteria on the external and internal surfaces in the arachnid under investigation were similar

**Key Words:** Microbiota, bacterium, *Ctenus amphora*.

### 1.INTRODUCTION

A microbiologia é o ramo da biologia que estuda os seres vivos microscópicos nos seus mais variados aspectos como morfologia, estrutura, fisiologia, reprodução, genética, taxonomia e também a interação com outros seres e com o meio ambiente (TORTORA, 2002).

Os microrganismos possuem uma gama de mecanismos metabólicos e podem colonizar praticamente qualquer habitat: solo, ar, pele, superfície inerte ou viva. Com os seres vivos, interagem quer como organismos comensais, não induzindo qualquer dano; quer como organismos simbióticos que se beneficiam da relação, ou mesmo como organismos patogênicos que causam enfermidades (PEPPER. & GERBA, 2005).

Os microrganismos residentes em um ser são inócuos e benéficos quando na sua localização normal no hospedeiro. Entretanto, podem provocar doença se forem introduzidos em locais estranhos, em grande número e ou a partir da presença de fatores predisponentes (PELCZAR, *et al.*, 1996).

As bactérias estão constantemente presentes nas superfícies corporais e seu crescimento em determinada área depende de fatores fisiológicos como: temperatura, umidade e presença de certos nutrientes e substâncias inibitórias.

Os diversos micro-ambientes existentes no organismo animal possuem equilíbrios refinados o que leva as bactérias a adaptarem-se a uma determinada região, resultando em uma distribuição não igualitária sobre as partes de um corpo. (TORTORA *et al.*, 2002).

O conhecimento da flora bacteriana de espécies selvagens que mantém contato com seres humanos em áreas urbanas e suas variações são de grande importância para a ecologia e para a área da saúde, pois revela bactérias de relevância para espécies selvagens, sociedade e ainda esclarece a flexibilidade das espécies hospedeiras quanto à riqueza de espécies de bactérias que podem ser consideradas normais (PESSOA, 2009).

Os trabalhos sobre a presença de microrganismos em aranhas são escassos tanto na literatura nacional quanto internacional. Dos existentes cita-se Morel (1977) que fala da ocorrência de *Rickettsiasp.* na aranha *Pisaura mirabilis*; Monteiro *et al.* (2002) que isolou *Clostridium perfringens*, uma bactéria causadora de infecções anaeróbicas a partir do veneno de *Loxosceles intermedia* (aranha-marrom).

Pouco se sabe sobre a presença de microrganismos em aranhas não construtora de teias; neste sentido, o presente trabalho visa estudar a microbiota da espécie de aranha *Ctenus amphora*.

## 2. METODOLOGIA

Com a licença número 125.171 para coleta de material biológico realizou-se três coletas no setor sul do campus da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e através da técnica de procura livre, no período noturno, foram coletados 20 indivíduos de *C. amphora*.

Para a coleta foram utilizados recipientes de plásticos estéreis de fábrica com etiquetas de identificação; quando as aranhas eram visualizadas, os potes eram abertos sobre as mesmas e pressionava-se o coletor até que o ctenídeo adentrasse totalmente no recipiente. Após a coleta, o material foi encaminhado para o laboratório de microbiologia-ICB/UFAM e processado.

### 2.1 ISOLAMENTO DE COLÔNIAS BACTERIANAS DA SUPERFÍCIE EXTERNA DO ARACNÍDEO

Após passar por um período de cinco minutos em temperatura abaixo de 0 °C os potes com as aranhas eram transferidos para o fluxo laminar que previamente havia sido esterilizado com álcool 70% e pela ação de raios UV.

Cada aranha era alocada em tubo de ensaio com 10 mL de solução salina estéril, dela foi realizada uma série de diluições até 10<sup>-5</sup>. Começando da maior diluição, retirou-se com pipeta automática 0,1 mL de solução e transferiu-se para placa de Petri contendo meio de cultura ágar sangue.

O ágar sangue é uma base rica e fornece condições de crescimento para a maioria dos microrganismos. Nele a conservação dos eritrócitos íntegros favorece a percepção da hemólise, úteis para a identificação de bactérias. As placas eram então incubadas em estufa de 37°C por 48 horas.

### 2.2 ISOLAMENTO DE COLÔNIAS BACTERIANAS DA SUPERFÍCIE INTERNA DO ARACNÍDEO

Após realizar a etapa necessária ao isolamento das bactérias da superfície externa ainda no fluxo laminar transferia-se a aranha do tubo de ensaio para uma placa de Petri estéril. Introduzia-se no canal retal da aranha uma pinça metálica estéril que depois era imersa em tubo com 10 mL de solução salina e agitada por um minuto.

Da solução foi realizada uma série de diluições até 10<sup>-5</sup>. Começando da maior diluição para a menor; retirou-se com pipeta automática 0,1 mL de solução e transferiu-se para placa de Petri contendo meio de cultura ágar sangue. As placas com o referido meio eram incubadas em estufa a 37°C por 48 horas.

### 2.3 PRESERVAÇÃO DOS MICRORGANISMO

Depois do período de incubação na estufa, as colônias que cresceram no meio de cultura ágar sangue foram codificadas e preservadas.

A preservação dos microrganismos foi procedida conforme os descritos de Muro e Luchi(1989) em glicerol e alocadas em baixa temperatura.

### 2.4 COLORAÇÃO DE GRAM

Cada colônia codificada foi reativada em tubo de ensaio contendo 9 mL de caldo nutriente e acondicionada em estufa de 37° C por um período de 24 horas, depois semeadas em placa de Petri contendo ágar nutriente.

Após o crescimento no meio de cultura, preparou-se um esfregaço bacteriano das colônias para realização da coloração de gram. Esta técnica baseasse no fato de que quando as bactérias são coradas com reagentes básicos, as células gram-negativas podem ser facilmente descoradas com solventes orgânicos (etanol, acetona), enquanto as células das espécies gram-positivas resistem a esta descoloração. Esta capacidade das células reterem ou perderem o corante reflete diferenças na estrutura fundamental da parede celular, a resposta à coloração de gram foi uma característica taxonômica importante, usada na identificação das bactérias.

Os procedimentos da coloração de gram seguiram as seguintes etapas: as células foram fixadas pelo calor e coradas com violeta cristal, que torna as células azuladas; o esfregaço foi depois tratado com lugol que permite que o iodo penetre nas células e forme um complexo insolúvel em água com o violeta cristal. Este complexo foi posteriormente eliminado com uma lavagem de álcool a 95%, que solubiliza o complexo iodo-violeta cristal.

Após o tratamento com o solvente apenas as bactérias gram positivas permanecem coradas, devido a sua espessa parede celular, que não é permeável ao solvente. As células foram então tratadas com um contra-corante (ácido fucsínico), que permite a visualização das células gram negativa que se encontram descoradas. As células gram negativas aparecem coradas de vermelho e as gram positivas de azul (violeta).

### 2.5 MICROSCÓPIA

Uma vez tendo sido feita a coloração de gram, as lâminas do esfregaço foram observadas em microscópio ótico, através de objetiva de 1000x. Por meio do microscópio determinou-se as características morfológicas da bactéria (cocos e bastonetes).

### 2.6 ESTUDO BIOQUÍMICO

As bactérias que haviam sido reativas no ágar nutriente passaram pelo procedimento de identificação de acordo com "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (2000). Assim, os testes realizados para caracterização bioquímica foram: respiração bacteriana, fermentação de açúcares, TSI – tríplex açúcar e ferro, utilização do citrato, motilidade, produção da catalase, redução de nitrato, gelatinase, oxidase, teste para verificar a produção da acetoina a partir da glicose (Vogesproskauer), indol, gás sulfídrico, cisteína, ágar manitol, EMB (Eosine Methylene Blye), TCBS (Ágar de tiosulfato, citrato, bilis e sacarose), ágar cetrimide.

### 2.7 INTERPRETAÇÃO DAS ANÁLISES MORFOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS

A técnica de coloração de gram permitiu a verificação da pureza das culturas então preservadas e a determinação de formas bacterianas, ou seja, cocos, bacilos e a presença de esporos e arranjos.

As bactérias com a morfologia de cocos foram cultivadas em ágar manitol e os testes da catalase, motilidade, oxidase e a respiração bacteriana permitiram o reconhecimento do gênero *Staphylococcus* spp. e da espécie *Staphylococcus aureus*

Para identificação dos bacilos gram negativos foram utilizados os meios de cultura seletivos: eosina azul de metileno (EMB), ágar cetremidi e TCBS. Ocorreu crescimento somente no meio EMB, ele favoreceu o

desenvolvimento de indivíduos da família Enterobacteriaceae que forma reconhecidos através das seguintes provas bioquímicas: catalase, oxidase, fermentação de lactose; reação ao gás sulfídrico; registro da capacidade de locomoção em meio de cultura, consumo de citrato como única fonte de carbono, liquefação da gelatina, produção de gás, Vogesproskauer rafinose e fermentação de maltose, positivo, manitol.

As bactérias gram positivas foram submetidas à coloração de esporos sendo que a não apresentaram de esporos passaram pelas provas da oxidase, catalase, motilidade, respiração bacteriana, reação ao gás sulfídrico, fermentação de glicose e redução de nitrato. Aquelas com esporos passaram também pelos testes supra-citados e pela fermentação do manitol, maltose, lactose, Vogesproskauer, citrato, gelatinase e caseína.

## 2.8 TESTES ESTATÍSTICOS

Para verificar se as diferenças nos micro-organismos encontrados nas aranhas na porção externa e interna e entre as fases (adulto x jovem) era significativa ou não foi realizado o teste de duas proporções empregando-se o software SYSTAT 12 (Systat Software Inc. 2007). Valores de p inferiores a 0,05 informam que as diferenças são significativas por outro lado valores superiores revelam uma diferença não significativa.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na realização deste trabalho foram isoladas e identificadas 223 amostras bacterianas obtidas de 20 indivíduos de *Ctenus amphora*. Foram reconhecidos 10 gêneros: *Bacillus* spp., *Enterobacter* spp., *Geobacillus* spp., *Klebsiella* spp., *Kurthia* spp., *Paenibacillus* spp., *Pirellula* spp., *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp. e 2 espécies: *Serratia rubidaea* e *Staphylococcus aureus*. (Tabela 1)

Os gêneros de microrganismos com maior número de colônias registradas foram: *Bacillus* spp. (46,6%), *Kurthia* spp. (21%), *Enterobacter* spp. (14,7%) dentre outros com menor repetição.

**Tabela 1 : Quantitativo das Colônias presente em *Ctenus amphora*.**

| Bactéria                        | Quantidade | %           |
|---------------------------------|------------|-------------|
| <i>Bacillus</i> spp.            | 104        | 46,6        |
| <i>Geobacillus</i> spp.         | 11         | 4,9         |
| <i>Kurthia</i> spp.             | 21         | 9,4         |
| <i>Paenibacillus</i> spp.       | 4          | 1,7         |
| <i>Pirellula</i> spp.           | 14         | 6,2         |
| <i>Staphylococcus</i> spp.      | 9          | 4           |
| <i>Staphylococcus aureus</i>    | 5          | 2,2         |
| <b>Bactérias gram positivas</b> | <b>168</b> | <b>75,3</b> |
| <i>Salmonella</i> spp.          | 5          | 2,2         |
| <i>Serratia rubidaea</i>        | 14         | 6,2         |
| <i>Enterobacter</i> spp.        | 33         | 14,7        |
| <i>Klebsiella</i> spp.          | 3          | 1,3         |
| <b>Bactérias gram negativas</b> | <b>55</b>  | <b>24,7</b> |

Verificou-se que as frequências de isolamentos bacterianos com a morfologia bacilos (93,7%) foram maiores que cocos (6,27%); enquanto que em relação à coloração de gram 75,3% dos casos foram negativos e 24,7% positivos.

Observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre as frequências de isolamentos de bactérias do gênero *Kurthia* spp. e de *Staphylococcus* spp (Tabela 2) quando comparadas as amostras obtidas das superfícies externa (N=20 aranhas) e interna (N=20 aranhas).

**Tabela 2: Comparação da Frequência Bacteriana nas Superfícies**

| Bactéria                     | Externa | Interna |
|------------------------------|---------|---------|
| <i>Kurthia spp.</i> *        | 8       | 2       |
| <i>Staphylococcus spp.</i> * | 4       | 0       |
| <i>Enterobacter spp.</i>     | 7       | 3       |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 2       | 0       |
| <i>Geobacillus spp.</i>      | 3       | 1       |
| <i>Pirellula spp.</i>        | 3       | 1       |
| <i>Salmonella spp.</i>       | 1       | 0       |
| <i>Paenibacillus spp.</i>    | 1       | 2       |
| <i>Bacillus spp.</i>         | 16      | 16      |
| <i>Klebsiella spp.</i>       | 1       | 1       |
| <i>Serratia rubidaea</i>     | 4       | 4       |

Houve ainda distinções estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) entre as frequências de isolamentos de bactérias do gênero *Pirellula spp.* quando comparadas aranhas adultas (N=9) e jovens (N=11) conforme a Tabela 3.

**Tabela 3: Comparação da Frequência Bacteriana entre Adultos e Jovens de Aranha**

| Microrganismo                | Adulto | Juvenil |
|------------------------------|--------|---------|
| <i>Bacillus spp.</i>         | 9      | 10      |
| <i>Enterobacter spp.</i>     | 4      | 4       |
| <i>Geobacillus spp.</i>      | 1      | 3       |
| <i>Klebsiella spp.</i>       | 1      | 1       |
| <i>Kurthia spp.</i>          | 2      | 7       |
| <i>Paenibacillus spp.</i>    | 1      | 2       |
| <i>Pirellula spp.</i>        | 3      | 0       |
| <i>Salmonella spp.</i>       | 1      | 0       |
| <i>Serratia rubidaea</i>     | 4      | 2       |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 1      | 1       |
| <i>Staphylococcus spp.</i>   | 1      | 3       |
| Total                        | 28     | 33      |

Quando verificada a ocorrência de microrganismos somente no exoesqueleto entre adultos (N=9) e jovens (N=11), foi observada diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) para de isolados de bactérias do gênero *Bacillus spp.* e de *Pirellula spp.* (Tabela 4).

**Tabela 4: Frequência Bacteriana No Exoesqueleto De Adultos E Jovens**

| Sítio de Isolamento Externo (exoesqueleto) |        |         |
|--|--------|---------|
| Microrganismos                             | adulto | Juvenil |
| <i>Bacillus spp.</i>                       | 9      | 7       |
| <i>Enterobacter spp.</i>                   | 3      | 4       |
| <i>Geobacillus spp.</i>                    | 1      | 2       |
| <i>Klebsiella spp.</i>                     | 0      | 1       |
| <i>Kurthia spp.</i>                        | 2      | 6       |

|                              |   |   |
|------------------------------|---|---|
| <i>Paenibacillus spp.</i>    | 0 | 1 |
| <i>Pirellula spp.</i>        | 3 | 0 |
| <i>Salmonella spp.</i>       | 1 | 0 |
| <i>Serratia rubidaea</i>     | 2 | 2 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 | 1 |
| <i>Staphylococcus spp.</i>   | 1 | 3 |

Quando verificada a ocorrência de microrganismos somente no canal retal entre adultos (N=9) e jovens (N=11), foi observada diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) para de isolados de bactérias do gênero *Bacillus* spp. e de *Serratia rubidaea* (Tabela 5).

**Tabela 5: Frequência bacteriana no canal retal de adultos e jovens**

| Sítio de Isolamento Interno  |        |         |
|------------------------------|--------|---------|
| Microrganismos               | adulto | Juvenil |
| <i>Bacillus spp.*</i>        | 9      | 7       |
| <i>Enterobacter spp.</i>     | 2      | 1       |
| <i>Geobacillus spp.</i>      | 0      | 1       |
| <i>Klebsiella spp.</i>       | 0      | 1       |
| <i>Kurthia spp.</i>          | 0      | 2       |
| <i>Paenibacillus spp.</i>    | 1      | 1       |
| <i>Pirellula spp.</i>        | 1      | 0       |
| <i>Salmonella spp.</i>       | 0      | 0       |
| <i>Serratia rubidaea*</i>    | 4      | 0       |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 0      | 0       |
| <i>Staphylococcus spp.</i>   | 0      | 0       |

Observando a ocorrência de microrganismos entre as superfícies exclusivamente dos adultos, verificamos diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) para o gênero *Kurthia* spp. (Tabela 6).

**Tabela 6: Frequência Bacteriana De Adultos**

| Micro-organismo              | Externo | Interno |
|------------------------------|---------|---------|
| <i>Bacillus spp.</i>         | 9       | 9       |
| <i>Enterobacter spp.</i>     | 3       | 2       |
| <i>Geobacillus spp.</i>      | 1       | 0       |
| <i>Klebsiella spp.</i>       | 0       | 0       |
| <i>Kurthia spp.</i>          | 2       | 0       |
| <i>Paenibacillus spp.</i>    | 0       | 1       |
| <i>Pirellula spp.</i>        | 3       | 1       |
| <i>Salmonella spp.</i>       | 1       | 0       |
| <i>Serratia rubidaea</i>     | 2       | 4       |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 1       | 0       |
| <i>Staphylococcus sp.</i>    | 1       | 0       |

A ocorrência de microrganismos entre as superfícies exclusivamente dos jovens, verificamos diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) para o gênero *Serratia rubidaea* e *Staphylococcus* spp. (Tabela 7).

**Tabela 7: Frequência Bacteriana De Jovens**

| Micro-organismo              | Externo | Interno |
|------------------------------|---------|---------|
| <i>Bacillus</i> spp.         | 7       | 7       |
| <i>Enterobacter</i> spp.     | 4       | 1       |
| <i>Geobacillus</i> spp.      | 2       | 1       |
| <i>Klebsiella</i> spp.       | 1       | 1       |
| <i>Kurthia</i> spp.          | 6       | 2       |
| <i>Paenibacillus</i> spp.    | 1       | 1       |
| <i>Pirellula</i> spp.        | 0       | 0       |
| <i>Salmonella</i> spp.       | 0       | 0       |
| <i>Serratia rubidaea</i> *   | 2       | 0       |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 1       | 0       |
| <i>Staphylococcus</i> spp.*  | 3       | 0       |

Ao aplicarmos a correção de Bonferroni para testes múltiplos, ou seja, divisão do  $\alpha$  pelo número de testes não foi encontrada relação significativa para nenhum dos casos. No entanto este método é considerado conservador (RICE, 1989). Desta forma não se deve desprezar os dados obtidos.

Este estudo caracteriza, pela primeira vez, a microbiota bacteriana em *Ctenus amphora*, que é uma aranha errante que forrageia na serrapilheira (UETZ, 1984) e que para obtenção de suas presas pode se deslocar por longas áreas, sendo assim suscetível a vários micro-organismos presentes no ambiente.

Este estudo verificou a presença de dez gêneros e duas espécies distintas de bactérias na referida aranha.

A maioria dos micro-organismos isolados foi observada tanto na porção externa quanto interna e em ambas as fases da aranha, juvenil e adulta; exceto *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus aureus*: isolados somente em amostras da superfície externa; *Pirellula* spp. (Apêndice 2) presentes somente em aranhas adultas e *Salmonella* spp. com ocorrência apenas no exoesqueleto de adultos.

Essas distinções podem estar relacionadas à presença transitória de tais bactérias no aracnídeo, pois os animais possuem dois tipos de microbiota: a residente, que consiste em tipos relativamente fixos, encontrados com regularidade em determinada área e em determinada idade; sendo que se perturbada, recompõe-se prontamente; e a transitória, que consiste em microrganismos não patogênicos ou potencialmente patogênicos que provém do meio ambiente, não provoca doença e não se estabelece de forma permanente na superfície (TANNOCK, 1995).

A inexistência de distinções entre microbiota externa e interna em *C. amphora* ratifica a pesquisa feita por Sologic & Rodriguez (2004) com a aranha *Tetranychus urticae*, onde os mesmos concluíram que não havia distinções nas superfícies do aracnídeo.

O micro-organismo com o maior número de colônias isoladas, foi o gênero *Bacillus* spp. (46,6%), que compreende um grupo diverso e extenso de espécies bacterianas (ROWAN *et al.*, 2001). Encontra-se basicamente no solo, matéria orgânica animal e vegetal nas condições mais variadas de temperatura, umidade, pH (ANVISA, 2004). Com exceção do *Bacillus cereus* e *B. anthracis*, as outras espécies de bacilos possuem pouco significado clínico para animais. Devido a sua característica de formar endósporo, *Bacillus* spp. toleram melhor as condições adversas do meio ambiente que as demais bactérias (ROWAN *et al.*, 2001).

Quando comparado a ocorrência de microrganismo na superfície externa e interna houve significância para os gêneros *Kurthia* e *Staphylococcus*, portanto o teste aplicado demonstrou que há diferença para estes micro-organismos nas porções corporais da aranha.

*Kurthia* possui espécies que se distribuem no ambiente e estão comumente na superfície de animais. A localização observada nesta pesquisa para o gênero *Staphylococcus* apóia os dados presentes na literatura de que estes cocos, amplamente distribuídos na natureza, costumam habitar pele e mucosas de animais (KLOOS & BANNERMAN, 1999).

Era esperada a obtenção de um número considerável de bactérias na porção externa das aranhas adultas, pois a superfície de contato maior amplia a adesão dos micro-organismos. Contudo, isto não ocorreu, o tamanho, então não pode ser determinante para adesão dos microrganismos às superfícies; segundo POMPERMAYER *et.al.*, 2001, os fatores que influenciam são: fase de multiplicação celular, propriedades da superfície, presença de matéria orgânica, pH e temperatura.

O gênero *Pirellula*, bactéria pedunculada, gram positiva que habita matéria orgânica particulada (Berg's Manual of determinative bacteriology), foi registrada pela primeira vez em uma aranha. Em *C.amphora*, ela foi mais frequente nos adultos, sendo observada somente na superfície externa. Sua presença em *Ctenus* é pertinente, pois as aranhas deste gênero possuem o hábito de forragear na serrapilheira.

#### 4. CONCLUSÃO

A presença de *Salmonella spp.*, *Staphylococcus spp.* e *Staphylococcus aureus* somente na porção externa, não permite determinar se estes micro-organismo são pertencentes da microbiota normal ou transitória do animal.

- ❖ A maioria das bactérias isoladas foram bacilos gram positivos.
- ❖ gênero *Bacillus* foi o microrganismo mais frequente.
- ❖ A metodologia de isolamento de colônias nas superfícies mostrou-se eficiente.

#### 5. REFERÊNCIAS

1. ALDRIGUE, M. M. **Aspectos da Ciência e Tecnologia de alimentos**. João Pessoa: Cidade Universitária/UFPB, 2002.
2. BERGEY, D.H & HOLT, J. G. **Bergey's manual of determinative bacteriology**, 9th, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
3. ANVISA, AGÊNCIA DE VIGILANCIA SANITÁRIA. **Deteção e identificação de bactérias de importância médica\_Manual de microbiologia clínica e controle de infecção em serviços de saúde**. Brasília: Anvisa, 2004.
4. KLOOS, W.E.; BANNERMAN, T. L. **Staphylococcus and Micrococcus In: MURRAY, P. R.; BARON, E.J.** 1999.
5. MONTEIRO CL, RUBEL R, COGO LL, MANGILI OC, GREMSKI W, VEIGA SS, 2002. **Isolation and identification of Clostridium perfringens in the venom and fangs of Loxosceles intermedia (brown spider): enhancement of the dermonecrotic lesion in loxoscelism**. *Toxicon*, 40(4): 409-18.
6. MOREL G. 1977. **Study of a "Rickettsiella" (Rickettsia) pathogen of the spider "Pisaura mirabilis"**. *Ann Microbiol (Paris)*, 128A(1): 49-59.
7. MURO, M. A. & LUCHI, M. R. **Preservação de microrganismos**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Toselo", 1989.
8. PELCZAR, M.J., CHAN, E.C.S., KRIEG, N.R. **Microbiologia – Conceitos e Aplicações**. São Paulo: Makron Books, 1996.
9. PEPPER, I.L. & GERBA, C.P. **Environmental microbiology – a laboratory manual**. 2ª edição, Elsevier Academic Press, Amsterdã, 2005.
10. PESSOA, C.A. **Bacterial and fungal microbiota evaluation in the companion tortoise (*Geochelone carbonaria*) and the analysis of the potential risk to human health 2009**. Dissertação de Mestrado-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo, 96f. 2009.

11. POMPERMAYER, P.; TERRA, W.R.; J.R.P.; FALCON, M.C. & SILVA FILHO, M.C. **Effects of soybean proteinase inhibitor on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*.** *Entomologic Experimentalis et Applicata*, 99:79-85, 2001.
12. ROWAN, N.J., DEANSK, A.J., GEMMEL, G., HUNTER, I.; CHAITHONG, T. **Putative virulence factor expression by clinical and food isolates of *Bacillus* spp. After growth reconstituted infant milk formulae.** *American Society for Microbiology*, v6 n 9 p 3873-3881, 2001.
13. SOLOGIC, H.D.; RODRIGUEZ, J.G. **Microorganisms associated with the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*.** *Journal of Invertebrate Pathology: Kentucky*, 2004.
14. TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia.** 6 ed., Porto Alegre, 827p, 2002.
15. TANNOCK, G.W., **Normal Microflora,** London: Chapman & Hall, 1995.
16. UETZ, G.W. **Habitat structure and spider foraging.** In: S.S. Bell, E.D. McCoy, H.R. Mushinsky *Habitat structure: The Physical arrangement of objects in space*, eds., p. 325-348, 1991.