

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA  
CURSO DE MESTRADO**

**POTENCIAL ANTAGÔNICO, SUSCETIBILIDADE  
ANTIMICROBIANA E FATORES DE VIRULÊNCIA DE  
*Enterococcus faecalis***

**CAMILA DE SOUZA CARNEIRO**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
MAIO, 2014**

**POTENCIAL ANTAGÔNICO, SUSCETIBILIDADE  
ANTIMICROBIANA E FATORES DE VIRULÊNCIA DE  
*Enterococcus faecalis***

**CAMILA DE SOUZA CARNEIRO**

Bacharel em Biotecnologia Industrial  
Universidade do Oeste de Santa Catarina, 2010

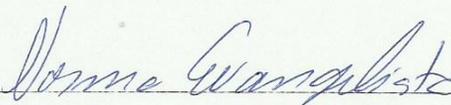
Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Norma Suely Evangelista Barreto  
Co-Orientadora: Dr<sup>a</sup> Margarete Alice Fontes Saraiva

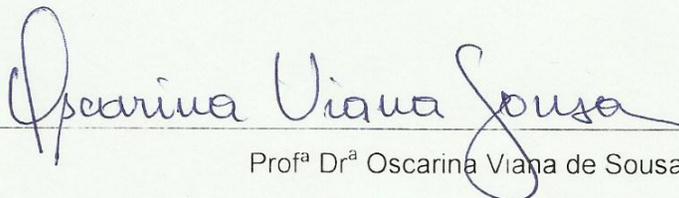
**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
MAIO, 2014**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA  
CURSO DE MESTRADO

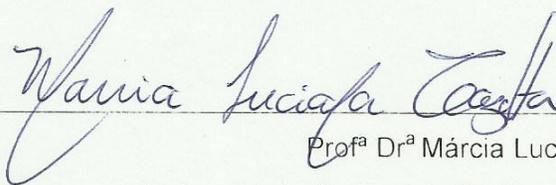
COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE  
CAMILA DE SOUZA CARNEIRO



Profª Drª Norma Suely Evangelista-Barreto  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB  
(Orientadora)



Profª Drª Oscarina Viana de Sousa  
Universidade Federal do Ceará



Profª Drª Márcia Luciana Cazetta  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Dissertação homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola em \_\_\_\_\_ conferindo o grau de Mestre em  
Microbiologia Agrícola em \_\_\_\_\_

Dedico esta dissertação a minha família.

## LISTA DE TABELAS

Página

### Capítulo 1

**Tabela 1.** Espécies de *Enterococcus* encontrados nos alimentos. 21

**Tabela 2.** Mecanismo de ação dos diversos agentes antimicrobianos. 26

### Capítulo 2

**Tabela 1.** Iniciadores para amplificação de fatores de virulência em *Enterococcus faecalis* isolados em amostras de água e moluscos bivalves. 46

**Tabela 2.** Relação da resistência e virulência entre os de *Enterococcus faecalis* que apresentaram potencial antagônico. 49

**Tabela 3.** Suscetibilidade antimicrobiana e concentração inibitória mínima (CIM) de *Enterococcus faecalis* isolados em amostras de água e moluscos bivalves. 50

## LISTA DE FIGURAS

Página

### Capítulo 1

**Figura 1.** Estratégia de seleção de micro-organismos probióticos para a aquicultura **25**

### Capítulo 2

**Figura 1.** Perfil da presença de genes relacionados à patogenicidade em culturas de *Enterococcus faecalis* isoladas em amostras de água e moluscos bivalves. **52**

# ÍNDICE

Página

<b>RESUMO</b>	
<b>ABSTRACT</b>	
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>10</b>
<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>13</b>
<b>Revisão: <i>Enterococcus</i> e seu caráter ambíguo</b>	
1. A história	16
2. O gênero <i>Enterococcus</i>	16
3. Produção de substâncias antagônicas	18
4. <i>Enterococcus</i> e os alimentos	20
5. <i>Enterococcus</i> e a produção animal	22
6. Probióticos na aqüicultura	23
7. Resistência antimicrobiana	26
7.1. Resistência Intrínseca	27
7.2. Resistência Adquirida	28
8. Fatores de virulência	29
Referências	31
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>Potencial antagônico, suscetibilidade antimicrobiana e fatores de virulência em linhagens de <i>Enterococcus faecalis</i></b>	<b>40</b>
<b>Resumo</b>	<b>41</b>
Introdução	42
Material e Método	44
Resultado e Discussão	47
Conclusão	54
Referências	55
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>61</b>

## RESUMO

### CARNEIRO, C. S. POTENCIAL ANTAGONICO, SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA E FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Enterococcus faecalis*

Este trabalho teve como objetivo verificar os fatores de virulência, a suscetibilidade aos antimicrobianos e a atividade antagonista de *Enterococcus faecalis* isolados de moluscos bivalves e da água de cultivo. Oitenta e sete cepas isoladas foram identificadas fenotipicamente e genotipicamente e posteriormente submetidas aos testes de antagonismo, suscetibilidade aos antimicrobianos (ampicilina, ciprofloxacina, gentamicina, imipinem, nitrofurantoina, tetraciclina e vancomicina), assim como a identificação dos fatores envolvidos na virulência (atividades de gelatinase, lipase, DNase e hemolítica) e presença dos genes *gelE*, *cyL<sub>LS</sub>*, *ccf*, *cpd* e *cob*. Trinta e sete por cento dos isolados inibiram *Listeria monocytogenes* (CERELA), *Listeria innocua* (CERELA), *Staphylococcus aureus* (ATCC25932), *Lactococcus lactis* (IL1403), *Micrococcus luteus* (ATCC10240) e *Enterococcus faecalis* (ATCC29212). Todos os isolados foram sensíveis a ampicilina, enquanto 47% apresentaram resistência à, pelo menos, um dos antimicrobianos testados, com multiresistência em 6% dos isolados. Noventa e sete por cento dos isolados apresentaram o gene *gelE*, no entanto, 77% deles apresentaram atividade de gelatinase. A presença do gene *cyL<sub>LS</sub>* foi observado em 25% das cepas, embora, apenas 5% deles tenha apresentado atividade hemolítica. Nenhum dos isolados apresentaram atividade de lipase e DNase. Oito por cento dos isolados possuem o gene *ccf*, 2% o gene *cpd* e 2% o gene *cob*. A capacidade de inibir bactérias patogênicas, assim como a baixa resistência aos antimicrobianos e a ausência de fatores de virulência apresentadas por algumas cepas de *Enterococcus faecalis* caracterizadas neste trabalho, as tornam promissoras para serem exploradas em outras aplicações, como probióticos na aquicultura.

**Palavras-chave:** Ambiente aquático, Antagonismo, *Enterococcus faecalis*, Moluscos.

## ABSTRACT

### CARNEIRO, C.S. ANTAGONISTIC ACTIVITY, ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY AND POTENTIAL VIRULENCE FACTORS OF *Enterococcus faecalis*

This study aimed to verify the virulence factors, antimicrobial susceptibility and antagonistic activity of *Enterococcus faecalis* strains isolated from bivalve molluscs and water of cultivation environment. Eighty-seven isolates were phenotypically and genotypically identified and subsequently subjected to the antagonism test, antimicrobial susceptibility to ampicillin, ciprofloxacin, gentamicin, imipenem, nitrofurantoin, tetracycline and vancomycin, as well as the identification of lipolytic, hemolytic and DNase activities and presence of genes, *gelE*, *cyiL*, *cyiS*, *ccf*, *cpd* and *cob*, encoding virulence determinants. Thirty seven percent of the isolates inhibited *Listeria monocytogenes* (CERELA), *Listeria innocuous* (CERELA), *Staphylococcus aureus* (ATCC25932), *Lactococcus lactis* (IL1403), *Micrococcus luteus* (ATCC10240) and *Enterococcus faecalis* (ATCC29212). All strains were susceptible to the antibiotic ampicillin, but 47% were resistant to at least one antimicrobial agent, and 6% of the isolates presented multidrug resistance. Ninety seven percent of the isolates contained *gelE* gene, however 77% of these isolates showed gelatinase activity. The presence of the *cyiL* and *cyiS* genes was observed in 25% of the isolates, however only 5% presented hemolytic activity. None of the isolates showed lipase and DNase activities. Eight percent of the isolates contained the *ccf* gene, 2% showed the presence of the *cpd* and *cob* genes. The ability to inhibit pathogenic bacteria, as well as the low resistance to antibiotics and the absence of virulence factors become some strains of *Enterococcus faecalis* characterized in this work promising to be explored in other applications such as probiotics in aquaculture.

**Key words:** Aquatic environment, Antagonism, *Enterococcus faecalis*, Molluscs.

# INTRODUÇÃO

Amplamente distribuídas na natureza às bactérias do gênero *Enterococcus* podem ser encontradas no solo, na água e em vegetais, fazendo parte da microbiota natural do trato gastrointestinal de animais de sangue quente (OGIER; SERROR, 2008). Por sobreviverem em ambientes com concentrações de sal de até 6,5%, pH entre 4,0 e 9,6 e temperaturas de 10°C a 45°C podem facilmente ser isolados de ambientes aquáticos, e em animais como moluscos bivalves, intestino de peixes e crustáceos (HAMMAD, SHIMAMOTO, SHIMAMOTO, 2014).

Dentre as bactérias lácticas, *Enterococcus* spp. é a que causa mais controvérsias (FOULQUIÉ-MORENO et al., 2006), pois embora possam ser utilizadas em processos fermentativos, contribuindo para o amadurecimento e desenvolvimento de aromas de alguns produtos cárneos e queijos (OGIER; SERROR, 2008; VALENZUELA et al., 2008; BARBOSA, GIBBS, TEIXEIRA, 2010), não são consideradas seguras uma vez que podem ser utilizadas como indicadores de contaminação fecal, além de apresentarem resistência a antimicrobianos utilizados como quimioterápicos (EATON; GASSON, 2001).

A sua capacidade de inibir outras bactérias, permite controlar o crescimento de micro-organismos indesejáveis nos alimentos (VALENZUELA et al., 2009). *Enterococcus* sp. possuem potencial probiótico, os quais podem fortalecer o sistema imunológico, reduzindo inflamações e reduzir a incidência de câncer de cólon (JIMENEZ et al., 2008).

Na produção animal, os probióticos são utilizados com suplementos alimentares, atuando na prevenção de doenças, influenciando no equilíbrio da microbiota gastrointestinal, estimulando o sistema imunológico e reduzindo ou eliminando patógenos (FRANZ et al., 2011).

Na aquacultura, o uso de probióticos causa efeitos benéficos tanto para o hospedeiro quanto para o ambiente de cultivo, em razão da melhoria na nutrição do hospedeiro ao estimular o crescimento e a sobrevivência; pela manutenção da qualidade da água; pela competição por espaço com bactérias patogênicas e pela produção de compostos antimicrobianos (DA SILVA et al., 2012).

A aplicação de cepas de *Enterococcus* como probióticos tem sido limitada, uma vez que estudos tem mostrado que isolados de alimentos, água e vegetais podem conter fatores de virulência e genes de resistência aos antimicrobianos (FRANZ et al., 2011). Essas características fazem com que seja necessária a realização de uma caracterização das cepas com potencial probiótico, quanto à patogenicidade e resistência a antimicrobianos usados como quimioterápicos (LEITE, 2011).

Em ambientes clínicos *Enterococcus* sp. foram considerados responsáveis por bacteremias, endocardites, infecções nosocomiais, bem como síndromes diarreicas em recém nascidos e infecções em feridas superficiais, principalmente devido ao aumento de cepas resistentes a vancomicina (BILLSTROM, et al., 2008; VALENZUELA et al., 2009).

Fatores de virulência podem ocorrer por meio de sucessivos eventos, que levam a colonização, adesão nos tecidos e resistência a mecanismos do sistema imune do hospedeiro. Dependendo do tipo de arranjo, estes fatores se tornam determinantes para o perfil de patogenicidade (JETT et al., 1994).

Alguns quimiorreceptores codificados pelos genes *Cob*, *Ccf* e *Cpd* contribuem para a formação de agregados celulares, facilitando a troca de material genético entre as células bacterianas, aumentando o grau de patogenicidade. Nos leucócitos humanos os produtos desses genes agem como quimiotáticos envolvidos na indução de processos inflamatórios (WIRTH, 2000; EATON; GASSON, 2001).

A citolisina é um peptídeo exclusivo do gênero *Enterococcus* que possui atividade inibitória contra bactérias Gram-positivas, codificado pelo gene estrutural *Cyl<sub>L/S</sub>* que também possui capacidade de hidrolisar os eritrócitos (BIRRI et al., 2013). *Enterococcus* sp. são também capazes de produzir gelatinase, uma metaloprotease que hidrolisa a gelatina, o colágeno, a hemoglobina e outros peptídeos bioativos (GOMES et al., 2008; WANG et al., 2011; CORMELATO, et al., 2013).

Assim, o conhecimento a respeito do potencial antagonista, da resistência aos antimicrobianos e dos fatores de virulência em *E. faecalis* é importante para a compreensão da ocorrência generalizada destes microrganismos no ambiente,

bem como a seleção e caracterização de cepas que possam ser utilizadas como probióticas na aquicultura.

## OBJETIVOS

### GERAL

O objetivo deste estudo foi caracterizar cepas de *E. faecalis* isoladas de moluscos bivalves e a água do seu cultivo quanto a sua atividade antagonista, a suscetibilidade aos antimicrobianos e a seus fatores de virulência.

### ESPECÍFICOS

- Identificar fenotipicamente e geneticamente os isolados;
- Avaliar a suscetibilidade das cepas de *E. faecalis* a antimicrobianos comerciais;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) das cepas que apresentarem resistência ao antimicrobiano;
- Avaliar a capacidade das culturas de *E. faecalis* em produzir as enzimas lipase, gelatinase e DNase, bem como, sua capacidade hemolítica;
- Avaliar o potencial antagonista das cepas estudadas;
- Verificar a presença dos genes de virulência: *gelE*, *cyl<sub>L/S</sub>*, *cob*, *ccf* e *cpd*.
- Propor a aplicação das culturas de *E. faecalis* como um potencial microrganismo para uso como probiótico na aquicultura.

---

## **CAPÍTULO 1**

**REVISÃO: O gênero *Enterococcus* e seu caráter ambíguo**

---

## RESUMO

### **CARNEIRO, C. S. REVISÃO: O gênero *Enterococcus* e seu caráter ambíguo**

O gênero *Enterococcus* foi descrito pela primeira vez como uma bactéria de origem intestinal humana. Atualmente, se sabe que as bactérias desse grupo podem ser encontradas nos mais variados ambientes, como o solo, em água, vegetais, trato gastro intestinal de animais e nos alimentos. Por se tratar de micro-organismos que resistem por mais tempo a variações de salinidade, pH e temperatura, podem ser isolados dos mais diferentes ambientes. Algumas linhagens possuem características benéficas ao homem sendo empregadas na produção de alimentos como, por exemplo, em processos fermentativos. Devido a capacidade de produzir substâncias antagonistas e ter capacidade probiótica, espécies desse gênero vem se destacando para aplicação na aquicultura. *Enterococcus* sp. se destacam como patógenos de infecções nosocomiais por apresentarem resistência antimicrobiana, o que confere ao gênero um caráter ambíguo.

**Palavras-chave:** alimentos, ambiente aquático, patogenicidade, potencial biotecnológico.

## **ABSTRACT**

### **CARNEIRO, C. S. REVIEW: *Enterococcus* GENUS AND ITS AMBIGUOUS CHARACTER**

*Enterococcus* genus was first described as a bacterium of the human intestinal origin. Currently, bacteria of this group can be found in various environments, such as soil, water, vegetables, foods and gastro intestinal tract of the animals. Because these micro-organisms are resistant any longer the variations of salinity, pH and temperature, they can be isolated from different environments. Some strains contain beneficial characteristics being used in food production, as example, in fermentation process. Due to the ability to produce inhibitory substances and probiotic characteristics, species of this genus has been highlighted for application in aquaculture. *Enterococcus* sp. are emerging as an important nosocomial pathogens and displayed drug resistance, which allowing the genu an ambiguous character.

**Key words:** Aquatic environment, biotechnological potential, *Enterococcus*, pathogenicity.

## 1. A HISTÓRIA

Thiercellin e Jouhaud em 1899 utilizaram pela primeira vez a palavra de origem francesa "enterococo" com a finalidade de enfatizar e descrever um diplococo Gram-positivo de origem intestinal humana. Em 1909, Andrewes e Horder isolaram uma bactéria de endocardite e propuseram o nome de *Streptococcus faecalis*. Um segundo micro-organismo do mesmo grupo que diferia do *Streptococcus faecalis* apenas em padrões de fermentação foi isolado em 1919 por Orla-Jensen e denominado *Streptococcus faecium* (KLEIN, 2003; GOMES et al., 2008).

Em 1933, baseado nas características antigênicas de um carboidrato de parede celular, Rebecca Lancefield, classificou estas bactérias como *Streptococcus* do grupo D. Em 1937, Sherman propôs a criação de quatro subgrupos: piogênico, viridans, láctico e enterococo. De acordo com o autor apenas os enterococos reagiriam com o anti-soro do grupo D. Em estudos posteriores foi demonstrado que *Streptococcus viridans* também era capaz de reagir com o anti-soro do grupo D (OGIER; SERROR, 2008).

A partir das características morfológicas, sorológicas e biológicas em 1970 Kalina sugeriu que *Streptococcus faecalis* e *Streptococcus faecium* fossem incluídos no gênero *Enterococcus*, contudo esta proposta não foi aceita. Posteriormente, estudos moleculares baseados em sequências nucleotídicas do DNA ribossomal 16S forneceram dados para Schleifer e Kilpper-Balz demonstrarem em 1984 que *Streptococcus faecalis* e *Streptococcus faecium* tinham relação com o gênero *Enterococcus* como anteriormente descrito por Kalina (OLIVEIRA; SIQUEIRA JUNIOR; SILVA, 2012).

## 2. O GÊNERO ENTEROCOCCUS

As bactérias do gênero *Enterococcus* pertencem ao grupo das bactérias do ácido láctico (BAL), são cocos Gram-positivos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos, oxidase e catalase negativa, e normalmente não móveis. Algumas espécies são pigmentadas, podendo ser encontradas isoladas, em pares ou cadeias curtas, de forma ovóide ou cocobacilar (HEW; KORAKLI; VOGEL, 2007).

Amplamente distribuídas na natureza ocorrem no solo, na água e em vegetais. Fazem parte da microbiota natural do trato gastrointestinal podendo ser isolados em concentrações de  $10^5$  a  $10^8$  UFC/g nas fezes. Sobrevivem em ambientes com concentrações de sal de até 6,5%, valores de pH entre 4,0 a 9,6 e temperatura de 10°C a 45°C, podendo sobreviver por 30 minutos a 60°C (OGIER; SERROR, 2008).

Atualmente, são conhecidas aproximadamente 40 espécies do gênero *Enterococcus*: *E. aquimarinus*, *E. asini*, *E. avium*, *E. caccae*, *E. camellinae*, *E. canintstini*, *E. canis*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. devriesei*, *E. díspar*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. flaccescens*, *E. gallinarum*, *E. garvieae*, *E. gilvus*, *E. haemoporexidus*, *E. hermannienseis*, *E. hiraie*, *E. italicus*, *E. lactis*, *E. moladoratus*, *E. moravienseis*, *E. mindtii*, *E. pallens*, *E. phoeniculicola*, *E. porcinius*, *E. plantarum*, *E. quebecenseis*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. ratti*, *E. saccharolyticus*, *E. saccharominimus*, *E. seriolicida*, *E. silesiicus*, *E. solitarius*, *E. sulfureus*, *E. termitis*, *E. thailandicus*, *E. ureasiticus*, *E. viikkienseis* e *E. villorum* (DSMZ, 2014).

As espécies de *E. faecium* e *E. faecalis* fazem parte da microbiota autóctone dos seres humanos e animais. Na produção de aves, bovinos e suínos *E. faecium* é a espécie mais frequente, embora outras espécies como *E. faecalis*, *E. cecorum*, *E. gallinarum*, *E. durans*, *E. hiraie* e *E. avium* também estejam presentes. Já as espécies *E. mundtii* e *E. casseliflavus* normalmente são encontrados nos vegetais (KLEIN, 2003).

*E. faecalis* e *E. faecium* são as espécies mais importantes, pois apesar de estarem envolvidas em uma série de infecções em ambientes clínicos, algumas linhagens podem ser utilizadas na produção de alimentos e como probióticos (FRANZ et al., 2011).

O papel tecnológico de *E. faecalis* e *E. faecium* na fabricação de carne e produtos lácteos é bem conhecido como, por exemplo, o desenvolvimento de aroma e maturação de diferentes queijos (FOULQUIÉ-MORENO et al., 2006; ABRIOEL et al., 2008). No entanto, sua utilização exige cuidado, uma vez que o gênero não possui o “status” GRAS (do inglês Generaly Recognized As Sefe) (EATON; GASSON, 2001), pois algumas linhagens podem ser utilizadas como

indicadores de contaminação de origem fecal e apresentarem genes de resistência a antimicrobianos (BARBOSA; GIBBS; TEIXEIRA, 2010).

Na aquicultura *Enterococos* sp. tem sido utilizados como culturas probióticas devido, principalmente, a sua característica antagonista (VALENZUELA et al., 2010).

### 3. PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTAGÔNICAS

Em geral, os micro-organismos produzem um grande número de substâncias antagônicas, tais como antibióticos e alguns subprodutos do metabolismo que incluem ácido lático, ácido acético, ácido propiônico, peróxido de hidrogênio, agentes líticos como lisozima, exotoxinas e também as bacteriocinas. Entre os inúmeros grupos de micro-organismos, as BAL são particularmente produtoras de bacteriocinas (TAGG; DAJANI; WANNAMAKER, 1976).

Os mecanismos de ação dos principais metabólitos com capacidade de inibir outros micro-organismos produzidos pelas BAL são descritos a seguir:

- **Ácidos orgânicos:** O efeito inibitório dos ácidos orgânicos, produzidos durante a fermentação pelas bactérias lácticas ocorre devido à redução do pH no meio e pela difusão facilitada dos ácidos na membrana citoplasmática. Assim, as bactérias deteriorantes, patogênicas e/ou toxigênicas são inibidas ou destruídas em consequência da dissipação da força próton-motora que desencadeia a supressão da síntese enzimática, do sistema de transporte de nutrientes, do metabolismo de aminoácidos e a síntese de material genético (JAY, 2005).
- **Peróxido de hidrogênio:** O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é produzido por algumas BAL's em condições aeróbias e serve como um mecanismo de proteção à toxicidade do oxigênio ( $O_2$ ). A sua ação antimicrobiana ocorre pela formação de radicais hidroxila livres ( $OH^\cdot$ ) e superóxidos ( $O_2^\cdot-$ ), que possui efeito oxidante na molécula do DNA, nas proteínas celulares e nos lipídios de membrana citoplasmática, aumentando a permeabilidade celular. Tanto as bactérias Gram-positivas quanto as Gram-negativas são

inibidas por esse agente, sendo as últimas as mais sensíveis (MATOS et al., 2009).

- **Lisozima:** Uma enzima antimicrobiana produzida por bactérias, plantas, insetos, aves e mamíferos que hidrolisa a ligação glicosídica  $\beta$  (1-4) entre o ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglicosamina presente na parede celular de alguns micro-organismos levando a lise celular (SILVA; KULA; FRANCO, 1999).
- **Bacteriocinas:** Segundo Oliveira et al. (2012) as bacteriocinas são proteínas biologicamente ativas sintetizadas nos ribossomos com efeito bactericida ou bacteriostático, que exibem propriedades antimicrobianas em espécies filogeneticamente próximas ou distantes à bactéria produtora. Em geral, são peptídeos catiônicos, anfipáticos, compostos de 30 a 60 resíduos de aminoácidos, com ponto isoelétrico elevado, que variam consideravelmente quanto ao micro-organismo produtor, ao espectro de ação, ao peso molecular e as suas propriedades bioquímicas. Diferenciam-se dos antibióticos em dois âmbitos principais, pelo fato das bacteriocinas não serem utilizadas no tratamento de doenças infecciosas e os antibióticos serem considerados ilegais como conservantes de alimentos (DE MARTINIS; ALVES; FRANCO, 2003). As bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas, incluindo as BALs, são comumente divididas em três classes. Na classe I, estão peptídeos pequenos (<5 kDa) denominados lantibióticos, devido à presença de aminoácidos modificados pós-traducionalmente. A reação de biossíntese dos lantibióticos envolve a desidratação dos resíduos de serina e treonina, resultando na formação de 2,3-dideidroalanina (Dha) ou (Z)-2,3-didehidrobutirina (Dhb), respectivamente. Quando um destes aminoácidos modificados reage com um resíduo de cisteína intrapeptídeo, uma ligação tioéster é formada gerando anéis de lantioninas ou  $\beta$ -metil-lantioninas (COTTER et al., 2005b; ASADUZZAMAN; SONOMOTO, 2009). Estas ligações são importantes para a atividade e estabilidade da bacteriocina contra proteólises e inativação térmica (HÉCHARD; SAHT, 2002; COTTER et al., 2005c). A

classe II consiste de peptídeos que não contêm lantionina, são pequenos (<10 kDa) e não possuem modificações pós-traducionais. Essa classe pode ser dividida em quatro subclasses, IIa, IIb, IIc e II d. A subclasse IIa compreende bacteriocinas de um peptídeo, denominadas *pediocin-like*, com atividade anti-*Listeria* e uma sequência consenso YGNGVXC na região N-terminal. A subclasse IIb compreende bacteriocinas de dois peptídeos diferentes, sendo necessária a presença de ambos para uma completa atividade antimicrobiana. A subclasse IIc consiste em bacteriocinas circulares em que suas extremidades N e C-terminal são covalentemente ligadas, resultando em uma estrutura cíclica. As bacteriocinas lineares, formadas por um peptídeo e que não apresentam seqüência similar à *pediocin-like* pertencem à subclasse II d. A maioria das bacteriocinas das classes I e II possuem atividade em concentrações nanomolar (NISSEN-MEYER et al., 2009). A classe III consiste de proteínas grandes (>30 kDa) termosensíveis, consideradas como bacteriolisinas e na classe IV, estão as bacteriocinas complexas que possuem um componente de lipídeo ou carboidrato (COTTER et al., 2005a; TIWARI; SRIVATAVA, 2008). Esse sistema de classificação pode eventualmente mudar a partir do momento em que novas seqüências de bacteriocinas tornam-se disponíveis juntamente com informações sobre suas características.

#### **4. *Enterococcus* E OS ALIMENTOS**

Por pertencer ao grupo das bactérias do ácido lático (BALs), *Enterococcus* sp. possuem características tecnológicas e são utilizadas em processos fermentativos, contribuindo para a maturação e o desenvolvimento de aromas, principalmente em produtos cárneos e queijos. Possuem a capacidade de exercer atividade probiótica, fortalecendo o sistema imune, reduzindo inflamações, podendo até mesmo estar envolvido na redução de incidência de câncer de cólon (OGIER; SERROR, 2007; VALENZUELA et al., 2008; BARBOSA; GIBBS; TEIXEIRA, 2010).

*Enterococcus* sp. podem ser isoladas de diversos alimentos como parte da sua microbiota normal (Tabela 1) (KLEIN, 2003).

**Tabela 1.** Espécies de *Enterococcus* encontrados nos alimentos.

Espécie	Queijo	Frutos do mar	Carne	Carne bovina picada	Lingüiça	Carcaça suína	Carne suína picada
<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. faecium</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. durans/hirae</i>	+	-	+	+	NR	+	+
<i>E. gallinarum</i>	-	+	+	+	NR	NR	+
<i>E. casseliflavus</i>	-	-	+	-	NR	NR	+
<i>E. mundtii</i>	-	+	+	NR	NR	NR	NR
<i>E. aviun</i>	NR	NR	NR	-	NR	NR	NR

NR= não relatado. += Positivo. - = Negativo.

Fonte: adaptado de KLEIN, 2003; FRANZ et al., 2011.

Algumas espécies como *E. faecalis* e *E. faecium* são capazes de interferir no desenvolvimento dos micro-organismos indesejáveis (patogênicos e/ou deteriorantes), por meio da competição por oxigênio, e produção de substâncias antagônicas com atividade contra *Bacillus cereus*, *Clostridium* spp., *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, sendo considerados organismos altamente competitivos (VALENZUELA et al., 2009). Desse modo, o uso de espécies produtoras de bacteriocinas como culturas *starters* durante a fermentação dos alimentos, tem sido proposto como controle de bactérias patogênicas, contribuindo para a estabilidade e segurança do produto (BARBOSA; GIBBS; TEIXEIRA, 2010).

A biopreservação em produtos a base de pescado e/ou mariscos exercida pela atividade antagonista de *Enterococcus* spp., vem sendo aplicada, visando principalmente o controle de *L. monocytogenes*, patógeno causador da listeriose (PINTO et al., 2009).

Algumas cepas de *Carnobacterium*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus* spp. e *Pediococcus* spp. isoladas de peixes, frutos do mar e surimi tem apresentado potencial probiótico no ambiente de cultivo. Assim, algumas linhagens bacteriocinogênicas isoladas desses ambientes estão sendo identificadas e caracterizadas (VALENZUELA et al., 2009).

Quando utilizadas como probióticos geralmente são encontradas na forma de "suplementos alimentares". Estas bactérias são utilizadas especialmente para

o tratamento de doenças como a síndrome do intestino irritável, diarreia associada a antimicrobianos, redução do colesterol e estimulação do sistema imune (FRANZ et al., 2011).

O uso de *Enterococcus* sp. na ração animal tem objetivos semelhantes, ou seja, atuar na prevenção de doenças, influenciando na microbiota gastrointestinal, estimulando o sistema imunológico e reduzindo ou eliminando patógenos. Muitos agentes patogênicos como espécies de *Salmonella*, *Campylobacter* ou *Escherichia* podem ser eliminados pela ação competitiva do probiótico e assim agir como medida de controle para garantir a segurança alimentar (FRANZ et al., 2011).

A obtenção de culturas adaptadas em frutos do mar ou em seu ambiente de cultivo se torna vantajoso em termos de garantir a qualidade desses alimentos que são consumidos “in natura” ou como conservação dos alimentos fermentados à base de pescado, bem como a sua aplicação na aquicultura como probióticos (PINTO et al., 2009).

Segundo Franz et al. (2011) a associação de *Enterococcus* sp. com doenças humanas tem sido visto com cautela quanto a sua utilização no desenvolvimento de produtos fermentados, de modo que as aplicações industriais até agora têm sido mínimas.

## **5. *Enterococcus* E A PRODUÇÃO ANIMAL**

Nos últimos anos, altas concentrações de antimicrobianos têm sido utilizadas no tratamento de doenças infecciosas em animais. Isso levou à seleção de bactérias resistentes e a disseminação de genes de resistência em populações microbianas no ambiente (FERREIRA et al., 2012). Isso tem feito com que diversas linhas de pesquisas biotecnológicas envolvidas na busca de alternativas para o controle de infecções por meio do emprego de organismos vivos e/ou substâncias naturais (vegetais ou microbianas) com ação antimicrobiana venham sendo desenvolvidas (DESRIAC et al., 2010; BORDIGNON, 2011).

As bactérias mais comumente utilizadas no biocontrole de infecções são *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Bacillus* e algumas espécies de leveduras como *Saccharomyces*, sendo as bactérias produtoras de ácido láctico as mais empregadas na produção de probióticos (BUSANELLO et al., 2012).

De acordo com a FAO (2002) os aspectos funcionais dos probióticos incluem tolerância à acidez gástrica, tolerância à atividade de hidrólise dos sais da bile, atividade antioxidante, produção de compostos antimicrobianos, capacidade de reduzir patógenos, habilidade de modulação da resposta imune e adesão no tecido intestinal.

As substâncias sintetizadas por micro-organismos estão sendo empregadas como alternativa no controle bacteriano em saúde animal. Neste ponto, as BALs são reconhecidas como produtoras de uma diversidade de metabólitos primários e secundários com ação antimicrobiana por meio dos quais se busca obter produtos purificados ou semi-purificados com alta especificidade e eficiência (BORDIGNON, 2011).

## **6. PROBIOTICOS NA AQUICULTURA**

As infecções bacterianas são consideradas um grande problema para a aquicultura causando a mortalidade em massa dos organismos aquáticos, especialmente durante os estágios larval e juvenil (PAILLARD et al., 2004). Pois na água do mar, os patógenos podem se proliferar independentemente do hospedeiro considerados como oportunistas atingindo em alta densidade em torno de animais aquáticos (DESRIAC et al., 2010). Entretanto a utilização de antimicrobianos na aquicultura não é aconselhável, pois aumenta o risco do surgimento de resistência a essas drogas podendo também afetar a microflora indígena dos organismos, podendo comprometer a saúde humana (HANSEN; OLAFSEN, 1999).

Diversas alternativas vêm sendo propostas na busca da modernização da cadeia produtiva aquícola, bem como no aumento da sua produtividade. Um exemplo disso é a suplementação com probióticos na dieta, que traz benefícios nutricionais e controle de infecções ao hospedeiro (RESENDE, 2009).

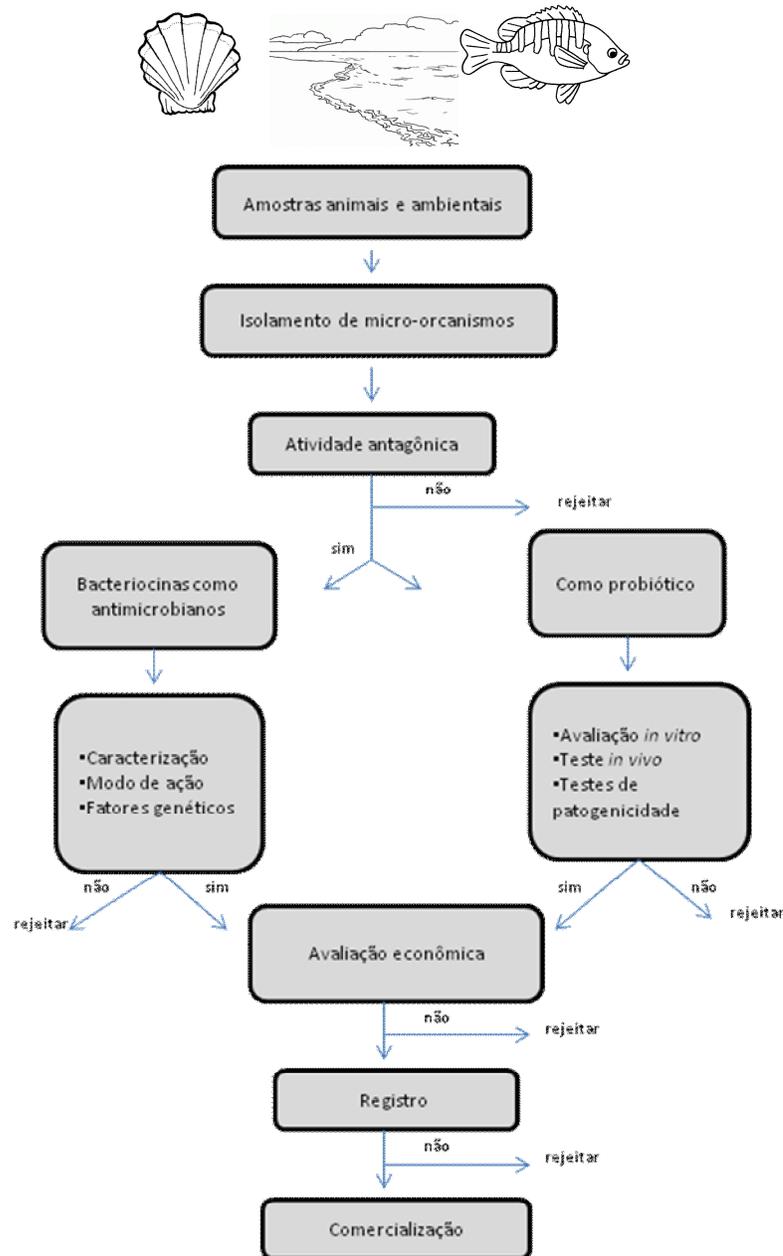
O termo probiótico, na aquicultura, aplica-se ao uso de suplementos microbianos vivos que tenham efeitos benéficos para o hospedeiro e para o ambiente de cultivo, em razão da modificação da comunidade microbiana, na melhoria da nutrição da espécie hospedeira por meio da produção de enzimas digestivas suplementares, maior crescimento e sobrevivência, melhor resposta imunológica do hospedeiro as doenças, manutenção da qualidade da água,

competição por espaço com as bactérias patogênicas, bem como a produção de compostos antimicrobianos (DA SILVA et al., 2012).

As cepas de bactérias e leveduras probióticas disponíveis no mercado geralmente são importadas e a sua eficácia não é comprovada nas condições de cultivo nacional (RESENDE, 2009). Desta forma, o desenvolvimento de probióticos isolados diretamente de organismos e no ambiente de cultivo, se apresenta como uma alternativa para aumentar a eficácia destes produtos a fim de facilitar o estabelecimento e eficiência sobre a temperatura e as variações de salinidade da aquicultura (RESENDE, 2009; DESRIAC et al., 2010).

A seleção (Figura 1) geralmente se dá por meio de testes de antagonismo *in vitro* em seguida, duas formas são possíveis: a utilização dos compostos de inibição como um antimicrobiano ou de bactérias como probióticos. A primeira alternativa tem o objetivo de determinar a natureza dos compostos inibitórios, o modo de ação, e as características genéticas. Na segunda alternativa o probiótico selecionado é submetido a pesquisa para avaliar da segurança e os efeitos benéficos em condições *in vivo*. A segurança tem que ser provado *in vitro* e em condições de criação do hospedeiro e também para o meio ambiente. Em seguida, os procedimentos comerciais podem ser submetidos às autoridades competentes para liberação do registro e comercialização (DESRIAC et al., 2010).

**Figura 1.** Estratégia de seleção de micro-organismos probióticos para a aquicultura.



Fonte: adaptado de DESRIAC et al., 2010.

Apesar das pesquisas quanto à utilização de probióticos na aquicultura ainda se encontrarem em fase inicial, a sua aplicação na produção de organismos aquáticos, como camarões, caranguejos, ostras e peixes, tem apresentado grande potencial na aquicultura marinha (PALACIOS; RAFAILANO, 2012). Em

sistemas de larvicultura, por exemplo, o acúmulo de amônia e nitrito na coluna d'água em razão da alta densidade de estocagem de fezes tem sido um fator limitante no sistema de produção, se fazendo necessária a troca de água dos tanques de cultivo. Em sistemas de cultivo com adição de probióticos, as trocas de água podem ser diminuídas ou até mesmo eliminadas, uma vez que os probióticos atuam na absorção e na decomposição da matéria orgânica tanto na água como no sedimento, melhorando a qualidade de água (WANG et al., 2005).

As bactérias lácticas dominam o mercado mundial de probióticos tanto para produção animal quanto na alimentação humana principalmente por possuírem o status GRAS. A eficácia e segurança dos probióticos devem ser examinados para receber o status de segurança obtido após o reconhecimento por peritos qualificados de acordo com as condições de utilização a que se destina (DESRIAC et al., 2010).

## 7. RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

A partir da identificação e utilização das penicilinas os antimicrobianos vem contribuindo no tratamento de infecções (JACOBY, 2007). Os antimicrobianos podem ser classificados como bactericidas, quando promovem a morte da bactéria ou bacteriostáticos quando inibem o seu crescimento (POETA et al., 2007).

Atualmente, as bactérias do gênero *Enterococcus* são consideradas um grande desafio para a medicina, pois possuem diversos mecanismos intrínsecos que conferem resistência aos antimicrobianos, podendo ainda adquirir multirresistência (VALENZUELA et al., 2010; BIRRI, et al., 2013).

A ação dos antimicrobianos ocorre por meio de diferentes mecanismos como apresentados na Tabela 2 (POETA et al., 2007).

**Tabela 2.** Mecanismo de ação dos diversos agentes antimicrobianos.

Agente	Sítio de ação	Efeito
$\beta$ -lactâmicos	Parede celular: proteínas de ligação a Penicilida	Inibe a transpeptidação, impede a síntese da parede celular
	Parede celular: terminal D-	Inibe a polimerização dos

Glicopeptídeos	alanil-D-alanina precursor do peptideoglicanose	de sacarídeos precusores de peptideoglicano, impede a síntese da parede celular
Aminoglicosídeos	Síntese protéica: subunidade 30S do ribossomo	Inibe o alongamento do peptídeo, causa leitura errada do código genético, inibe a síntese protéica
Tetraciclina	Síntese protéica: Subunidade 30S do ribossomo	Inibe a ligação com o tRNA, inibe síntese proteica
Quinolonas	Síntese de ácido nucléico: DNA girase e topoisomerase IV	Dificultam o espiralamento do DNA, inibe a síntese do DNA
Nitrofurano	Síntese de proteínas e metabolismo da glicose	Inibição da acetilcoenzima A, alteram a síntese de RNAm,

Fonte: adaptado de RUSSEL; ANDREAZZI, 2005; TAVARES, 2009.

A resistência aos agentes antimicrobianos pode ser resultado da necessidade da bactéria em sobreviver e persistir em ambientes altamente competitivos, como o trato gastrointestinal (BIRRI et al., 2013).

A resistência pode ser dividida em duas classes: a) intrínseca, onde as bactérias podem não possuir os sítios de ligação do antimicrobiano ou por estas substâncias não serem capazes de atravessar a parede celular, e b) adquirida, quando transposons ou plasmídeos são adquiridos e resultam em mutações pontuais podendo acumular genes de resistência (RUSSEL; ANDREAZZI, 2005; BIRRI et al., 2013).

### 7.1 Resistência Intrínseca

Algumas espécies de bactérias possuem mecanismos que conferem resistência aos agentes antimicrobianos, estes mecanismos conferem o que pode ser chamado de resistência intrínseca. *E. faecalis* possui resistência intrínseca aos  $\beta$ -lactâmicos devido à produção de um grupo de proteínas de ligação à penicilina conhecido como PLP. A proteína de ligação à penicilina mais

frequentemente associada à resistência aos  $\beta$ -lactâmicos em *E. faecalis* é a PLP5 que confere baixo nível de resistência (RUSSEL; ANDREAZZI, 2005).

Todas as espécies de *Enterococcus* possuem resistência a baixas concentrações de aminoglicosídeos, devido à dificuldade que essas moléculas têm de serem transportadas para dentro da célula. Por serem pouco permeáveis normalmente é utilizado na forma associada aos  $\beta$ -lactâmicos ou glicopeptídeos, o que facilita sua entrada na célula (TAVARES, 2009).

A vancomicina é um glicopeptídeo usado no tratamento de doenças causadas por bactérias Gram-positivas ou em casos de alergia aos  $\beta$ -lactâmicos. Os glicopeptídeos são moléculas grandes, constituídas por sete peptídeos, os quais se ligam a sete anéis aromáticos. *Enterococcus* sp. possui resistência à vancomicina devido a alterações na síntese da parede celular o que impede sua ação (TAVARES, 2009).

O aumento no uso de antimicrobianos pode ter relação com o aumento da incidência de infecções causadas por *Enterococcus* sp., pois estas bactérias possuem resistência intrínseca a alguns antimicrobianos. A pressão exercida por meio do uso de antimicrobianos pode provocar a seleção de culturas resistentes e ser um fator determinante para o aumento de infecções causadas por bactérias resistentes (POETA et al., 2007).

## **7.2 Resistência Adquirida**

Este tipo de resistência ocorre pela transferência de material genético como, plasmídeos, transposons ou integrons. Esses genes codificam enzimas que conferem resistência aos antimicrobianos podendo ser transmitidos de forma interespecífica ou intraespecífica (ARCIOLA et al., 2008).

A transferência de plasmídeo tem sido documentada em ambientes aquáticos indicando que a ocorrência de culturas resistentes nesses ambientes é um fator preocupante devido à possibilidade dessa resistência ser transferida, ocasionando o surgimento de micro-organismos multirresistentes (OLIVEIRA; PINHATA, 2008; EVANGELISTA-BARRETO et al., 2012).

## 8. FATORES DE VIRULÊNCIA

Segundo Billstrom et al. (2008) o gênero *Enterococcus* é considerado um patógeno relacionado com bacteremias, endocardites, infecções nosocomiais da corrente sanguínea, sistema nervoso central, do trato urinário e coração, síndromes diarréicas em recém nascidos, colonizando ou causando infecções em feridas superficiais. As espécies mais comumente relacionadas as infecções são *E. faecalis* e *E. faecium* (HEW; KORAKLI; VOGEL, 2007).

A capacidade de *Enterococcus* sp. em colonizar indivíduos na maioria das vezes sem provocar infecções ou sobreviverem em objetos inanimados por longos períodos, os tornam potentes patógenos de infecções nosocomiais (EATON; GASSON, 2001).

Alguns estudos têm relacionado a severidade das infecções causadas por *Enterococcus* sp. com os genes móveis de virulência (EATON; GASSON 2001; GOMES et al., 2008). A virulência pode ocorrer por eventos sucessivos de invasão, adesão, colonização e resistência a mecanismos do sistema imune do hospedeiro dependendo do tipo de arranjo, estes se tornam determinantes para o perfil patogênico (JETT et al., 1994).

Alguns quimiorreceptores codificados pelos genes *Cob*, *Ccf* e *Cpd* contribuem para a formação de agregados celulares, facilitando a troca de material genético entre as células bacterianas, aumentando o grau de patogenicidade. Nos leucócitos humanos esses fatores agem como quimiotáticos envolvidos na indução de processos inflamatórios (WIRTH, 2000; EATON; GASSON, 2001). Apesar de alguns autores não considerarem os feromônios como fator de virulência, a presença desses genes em *Enterococcus* pode favorecer a disseminação de determinantes de virulência e promover aquisição de resistência a antibióticos e outros traços associados de outros *Enterococcus* e levar ao aumento da virulência (EATON; GASSON, 2001).

A hemolisina é um dos marcadores fenotípicos que possivelmente atua como um fator de virulência em cepas de *E. faecalis*. *Enterococcus* sp. que apresenta perfil  $\beta$ -hemolítico também podem produzir enterocinas com atividade inibitória contra bactérias Gram-positivas. Cerca de 60% dos *E. faecalis* que possuem hemolisina e bacteriocina expressos pelo mesmo determinante genético recebem a denominação de citolisina, linhagens que expressam esta proteína

apresentam 10 vezes mais patogenicidade. Este fator contribui para a proliferação do micro-organismo na corrente sanguínea visto que sua atividade se dá sobre as hemácias, os macrófagos e neutrófilos (GOMES et al., 2008).

*Enterococcus* spp. possuem capacidade de hidrolisar a gelatina, o colágeno, hemoglobina e outros peptídeos bioativos. Esta enzima pode estar relacionada com a indução do processo inflamatório (CORMELATO et al., 2013), que pode causar danos ao hospedeiro de duas formas: por meio da degradação direta do tecido conjuntivo ou por meio da ativação de metaloproteases da matriz extracelular do hospedeiro. Este último atua na desregulação de componentes essenciais ao sistema imune do hospedeiro com degradação de imunoglobulinas (WANG et al., 2011). Mas sua utilização proteolítica frente a alguns substratos de interesse industrial também é conhecida (VALENZUELA et al., 2010).

## REFERÊNCIAS

ARCIOLA, C. R.; BALDASSARRI, L.; CAMPOCCIA, D.; CRETÌ, R.; PIRINI, V.; HUEBNER, J.; MONTANARO, L. Strong biofilm production, antibiotic multi-resistance and high gelE expression in epidemic clones of *Enterococcus faecalis* from orthopaedic implant infections. **Biomaterials**, Surrey, v.20, p. 580-586, 2008.

ABRIOUEL, H.; OMAR, N. B.; MOLINOS, A. C.; LÓPEZ, R. L.; GRANDE, M. J.; MARTÍNEZ-VIEDMA, P.; ORTEGA, E.; CAÑAMERO, M. M.; GALVEZ, A. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable food, water and soil, and clinical samples. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.123, p. 38-49, 2008.

ASADUZZAMAN, S. M.; SONOMOTO, K. Lantibiotics: Diverse activities and unique modes action. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v.107, p. 475-487, 2009.

BARBOSA, J.; GIBBS, P.A.; TEIXEIRA, P. virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented maet products produced in the North of Portugal. **Food Ctronrol**, Guildford, v. 21, p. 651-656, 2010.

BEILLSTROM, H.; LUND, B.; SULLIVAN, A.; NORD, C. E. Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Oxford, v. 32, p. 374-377, 2008.

BIRRI, D. J.; BREDE, D. A.; TESSEMA, G. T.; NES, I. F. Bacteriocin production, antibiotic susceptibility and prevalence of haemolytic and gelatinase activity in faecal lactic acid bacteria isolated from healthy ethiopian infants. **Microbioial Ecology**, New York, v. 65, p. 504-516, 2013.

BORDIGNON, S. E. J. **Seleção de biocompostos antimicrobianos produzidos por bactérias lácticas**. 2011. 119 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos/Engenharia de Bioprocessos e Biologia). Universidade Federal do Paraná.

BUSANELLO, M.; POZZA, M. S. S.; BARROS, P. C.; CHAMBO, P. S.; ECKSTEIN, I. I. Probióticos, seus modos de ação e a produção animal. **Scientia Agrária Paranaensis**, Curitiba, v. 11, n. 4, p. 14-24, 2012.

COMERLATO, C. B.; DE RESENDE, M. C. C.; CAIERÃO, J.; D'AZEVEDO, P. A. Presence of virulence factors in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* susceptible and resistant to vancomycin. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.108, n. 5, p. 590-595, 2013.

COTTER, P.D., HILL, C., ROSS, R.P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, p. 777-788, 2005 (a).

COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, R.P. Bacterial lantibiotics: Strategies to therapeutic potencial. **Current Protein and Peptide Science**, Gainesville, v. 6, p. 61-75, 2005 (b).

COTTER, P.D., O'CONNOR, P.M., DRAPER, L.A., LAWTON, E.M., DEEGAN, L.H. HILL, C., ROSS, R.P. Posttranslational conversion of L-serines to D-alanines is vital for optimal production and activity of the lantibiotic lactacin 3147. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Boston, v. 102, p. 18584-18589, 2005 (c).

DA SILVA, E. F.B.; SOUZA JUNIOR, E. A.; SOARES, R. B.; GÁLVEZ, A. O.; PEIXOTO, S. R. M. Food consumption of marine shrimp *Litopenaeus vannamei* in closed system with the use of probiotics. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 4, n. 3, p. 349-352, 2009.

DA SILVA, E. F. B.; FRÓES, C. N.; SOUZA, D. M.; SOARES, R.; PEIXOTO, S.; WASIELESKY, W.; BALLESTER, E. L. C. Uso de probióticos na produção de larvas de camarão-rosa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 6, p. 869-874, 2012.

DE MARTINIS, E. C. P.; ALVES, V. F.; FRANCO, B. G. D. M. Bioconservação de Alimentos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 29, n.1, p. 114-119, 2003.

DESRIAC, F.; DEFER, D.; BOURGOUGNON, N.; BRILLET, B.; LE CHEVALIER, P.; FLEURY, Y. Bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: inventory and potential applications as an aquaculture probiotic. **Marine Drugs**, Basel, v. 8, n. 4, p. 1153-1177, 2010

DSMZ. **Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen**. Disponível em: <<https://www.dsmz.de/catalogues/cataloguemicroorganisms.html#searchResult>>. Acesso em: 22, Abril 2014.

EATON, T, J.; GASSON, M. J. Molecular Screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n. 4, p. 1628-1635, 2001.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S.; CARVALHO, F. C. T.; MENEZES, F. G. R.; SILVA, C. M.; ROCHA, R. S; SOUSA, O. V.; FERMANDES-VIERIA, R. H. S. Bathing suitability and antimicrobial susceptibility of *Enterococcus* in tropical coastal waters. **Arquivos de Ciências do Mar**, Fortaleza, v.45, n. 1, p. 62-68, 2012.

FAO-FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food London, Ontario, Canada, 2002.

FERREIRA, A. H. C.; ARARIPE, M. N. B. A.; MONTEIRO, C. A. B.; LOPES, J. B.; ARARIPE, H. G. A. A. Uso de probióticos na aquicultura – Revisão. **Revista Eletrônica Nutritime**, São Paulo, v. 9, n. 5, p. 1965-1980, 2012

FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.106, p. 1-24, 2006.

FRANZ, C. M. A. P.; HUCH, M; ABRIOUEL, H.; HOLZAPFEL, W.; GÁLVEZ, A. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.151, p.125-140, 2011.

GOMES, B.C.; ESTEVES, C. T.; PALAZZO, I. C. V.; DARINI, A. L. C.; FELIS, G. E.; SECHI, L. A.; FRANCO, B. D. G. M.; DE MARTINIS, E. C. P. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. Isolados from Brazilian foods. **Food Microbiology**, London, v.25, p. 666-675, 2008.

HAMMAD, A. M.; SHIMAMOTO, T.; SHIMAMOTO, T. Genetic characterization of antibiotic resistance and virulence factors in *Enterococcus* spp. from Japanese retail ready-to-eat raw fish. **Food Microbiology**, London, v.38, p. 62-66, 2014.

HANSEN, G.H.; J.A. OLAFSEN. Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. **Microbial Ecology**, New York, v.38, n.1, p 1-26, 1999.

HÉCHARD, Y.; SAHL, H.G. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. **Biochimie**, Paris, v.84, p. 545-557, 2002.

HEW, M. C.; KORAKLI, M.; VOGEL, F. R. Expression of virulence-related genes by *Enterococcus faecalis* in response to different environments. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.30, p. 257-567, 2007.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed., Porto Alegre: Artmed, 711p. 2005.

JACOBY, T. S. **Associação entre consumo de antimicrobianos e multirresistencia bacteriana em centro de terapia intensiva do Hospital Universitário Brasileiro, 2004-2006**. 2007. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

JETT, B. D.; HUYNCKE, M. M.; GILMORE, M. S. Virulence of enterococci. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.7, p. 462-478, 1994.

JIMÉNEZ, E.; DELGADO, S.; FERNÁNDEZ, L.; GARCÍA, N.; ALBÚJAR, M.; GÓMEZ, A.; RODRÍGUEZ, J. M. Assessment of the bacterial diversity of human colostrum and screening of staphylococcal and enterococcal populations for potential virulence factors. **Research in Microbiology**, Paris, v.159, p. 595-601, 2008.

KLAENHAMMER, T. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS - Microbiological Reviews**, Amsterdam, v.12, p. 38-85, 1993.

KLEIN, G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 88, p. 123-131, 2003.

LANDGRAF, M. **Microrganismos Indicadores Em: Microbiologia de Alimentos**. São Paulo: Ateneu, 142p. 2005.

LEITE, S. L. F. **Caracterização de *Enterococcus* isolados de barbigão da Ria de Aveiro**. 2011. 92f. Dissertação (Mestrado em Biologia Aplicada). Universidade de Aveiro.

MATOS, B. M.; DECO, C. P.; OLIVEIRA, L. D.; JORGE, A. O. C.; BALDUCCI, I.; KOGA-ITO, C. Y. Comparação da atividade antimicrobiana de soluções de peróxido de hidrogênio e malva sobre *Candida albicans*. **Ciência Odontológica Brasileira**, São Jose dos Campos, v. 12, n. 2, p. 24-28, 2009.

NASCIMENTO, M. S.; MORENO, I.; KUAYE, A.Y. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas, v.11, n. 2, p. 120-127, 2008.

NIESSEN-MEYER, J.; RONGE, P.; OPPEGARD, C.; HAUGEN, H.S.; KRISTIANSEN, P.E. Structure-Function relationships of the non-lanthionine containing peptide (class II) bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, Koeln-Wipperfuert, v.10, p.19-37, 2009.

OGIER, J. C.; SERROR, P. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v. 126, p. 291-301, 2008.

OLIVEIRA, A. J. F. C.; PINHATA, J. M. W. Antimicrobial resistance and species composition of *Enterococcus* spp. isolated from waters and sands of marine recreational beaches in Southeastern Brazil. **Water Research**, New York, v. 42, p. 2242-2250, 2008.

OLIVEIRA, C. P.; SIQUEIRA JUNIOR, J. P, SILVA, J. P. Bacteriocinas como alternativa da conservação de alimentos. **Revista Verde**, Mossoró, v. 7, n.1, 01-07, 2012.

PALACIOS, M. A. D.; RAFAILANO M. G. M. **Efecto de probiótico a base de *Bacillus* sp., *Enterococcus* sp., *Pediococcus* sp. y *Lactobacillus* sp., em La sobrevivência y crecimiento larval Del camarón Blanco *Litopenaeus vannamei*, en La estación de maricultura lós cóbanos, sonsonate.** 2012. 151f. Dissertação (Mestrado em Veterinária). Univerdad de El Salvador.

PAILLARD, C.; LE ROUX. F.; BORREGO. J. J. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: trends and evolution. **Aquatic Living Resources**, Montrouge, v.17, p. 477-498, 2004.

PINTO, A. L.; FERNANDES, M.; PINTO, C.; ALBANO, H.; CASTILHO, F.; TEIXEIRA, P.; GIBBS, P. A. Characterization of anti-listeria bacteriocins isolated from shellfish: potential antimicrobials to control non-fermented seafood. **International journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 129, p. 50-58, 2009.

POETA, P.; COSTA, D.; IGREJAS, G.; RODRIGUES, J.; TORRES, C. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in faecal enterococci from wild boars (*Sus scrofa*). **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 125, p. 368-374, 2007.

RESENDE, E. K. Pesquisa em rede em aquicultura: bases tecnológicas para o desenvolvimento sustentável da aquicultura no Brasil. Aquabrazil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, p. 52-57, 2009.

RUSSEL, F.; ADREAZZI, D.B. **Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma**. Editora Atheneu 2005.

SILVA, M. E.; KULA, M. R.; FRANCO, T. T. Uso de polietilenoglicol modificado para purificação de lisozima em sistema de duas fases aquosas. **Revista de Ciência e Tecnologia**, Piracicaba, v. 14, p. 105-112, 1999.

TAVARES, W. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico**. 2 ed., Rio de Janeiro: Atheneu, 620p. 2009.

TAGG, J. R.; DAJANI, A. S.; WANNAMAKER, L. W. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Bacteriological Reviews**, Baltimore, v.40, n. 3, p. 722-756, 1976.

THEVENON, F.; REGIER, N.; BENAGLI, C.; TONOLLA, M.; ADATTE, T.; WILDI, W.; POTÉ, J. Characterization of fecal indicator bacteria in sediments cores from the largest freshwater lake of western Europe (Lake Geneva, Switzerland). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 78, p. 50-56, 2012.

TIWARI, S.K.; SRIVASTAVA, S. Purification and characterization of plantaricin LR14: a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LR/14. **Applied Microbiology Biotechnology**, Oxford, v. 79, p. 759-767, 2008.

VALENZUELA, A. S.; OMAR, N. B.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R. L.; ORTEGA, E.; CAÑAMERO, M. M.; GÁLVEZ, A. Risk factors in enterococci isolated from foods in Marocco: determination of antimicrobial resistance and incidence of virulencia trans. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, p. 2648-2652, 2008.

VALENZUELA, A. S.; OMAR, N. B.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R. L.; VELJOVIC, K.; CAÑAMERO, M. M.; TOPISIROVIC, M. K. L.; GÁLVEZ, A. Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins em enterococci from artisan foods of animal orgin. **Food Control**, Guildford, v.20, p. 381-835, 2009.

VALENZUELA, A. S.; BENOMAR, N.; ABRIOUEL, H.; CAÑAMERO, M. M.; GÁLVEZ, A. Isolation and indentification of *Enterococcus faecium* from seafoods: Antimicrobial resistance and production of bacteriocin-like substances. **Food Microbiology**, London, v.27, p. 955-961, 2010.

WANG, Y. B.; XU, Z. R.; XIA, M. S. The effectiveness of commercial probiotics in northern white shrimp *Penaeus vannamei* ponds. **Fisheries Science**, Tokyo, v.71, p. 1036-1041, 2005.

WANG, L.; DONG, M; ZHENG, J.; SONG, Q.; YIN, W.; LI, J.; NIU, W. Relationship of biobilm formation and gelE gene expression in *Enterococcus faecalis* recoverd from root canals in patients requiring endodontinc retreatment. **Clinical Research**, Thorofare, v. 37, n. 5, p. 631-636. 2011.

WIRTH. R. Sex pheromones and gene transfer in *Enterococcus faecalis*. **Research in Microbiology**, Paris, v.151, p. 493-495, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Almost Half the World's People have no Acceptable Means of Sanitation. 2006. Disponível em:

<[http://search.who.int/search?q=Almost+Half+the+World%E2%80%99s+People+have+no+Acceptable+Means+of+Sanitation&ie=utf8&site=who&client=\\_en\\_r&proxystylesheet=\\_en\\_r&output=xml\\_no\\_dtd&oe=utf8&getfields=doctype](http://search.who.int/search?q=Almost+Half+the+World%E2%80%99s+People+have+no+Acceptable+Means+of+Sanitation&ie=utf8&site=who&client=_en_r&proxystylesheet=_en_r&output=xml_no_dtd&oe=utf8&getfields=doctype)>. Acesso em 22, Abril 2014.

---

## **CAPÍTULO 2**

### **POTENCIAL ANTAGÔNICO, SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA E FATORES DE VIRULÊNCIA EM LINHAGENS DE *Enterococcus faecalis***

---

Este trabalho será submetido à revista Semina: Ciências Agrárias.

**POTENCIAL ANTAGÔNICO, SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA E FATORES  
DE VIRULÊNCIA EM LINHAGENS de *Enterococcus faecalis***

**ANTAGONISTIC ACTIVITY, ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY AND POTENTIAL  
VIRULENCE FACTORS OF *Enterococcus faecalis***

Camila de Souza Carneiro<sup>a\*</sup>; Irana Paim Silva<sup>a</sup>; Carla Silva da Silveira-Oliveira<sup>a</sup>; Marly Silva Santos<sup>a</sup>; Margarete Alice Fontes Saraiva<sup>b</sup>; Norma Suely Evangelista-Barreto<sup>c</sup>.

**Resumo**

---

Este trabalho teve como objetivo verificar os fatores de virulência, a suscetibilidade aos antimicrobianos e a atividade antagonista em *Enterococcus faecalis* isolados de moluscos bivalves e da água de seu cultivo. Oitenta e sete cepas isoladas foram identificadas fenotipicamente e genotipicamente e posteriormente submetidas aos testes de antagonismo, suscetibilidade aos antimicrobianos, ampicilina, ciprofloxacina, gentamicina, imipinem, nitrofurantoina, tetraciclina e vancomicina, assim como a identificação dos fatores envolvidos na virulência (atividades de gelatinase, lipase, DNase e hemolítica), presença dos genes *gelE*, *cyLLS*, *ccf*, *cpd* e *cob*. Trinta e sete por cento dos isolados inibiram *Listeria monocytogenes* (CERELA), *Listeria innocua* (CERELA), *Staphylococcus aureus* (ATCC25932), *Lactococcus lactis* (IL1403), *Micrococcus luteus* (ATCC10240) e *Enterococcus faecalis* (ATCC29212). Todos os isolados foram sensíveis a ampicilina, enquanto 47% apresentaram resistência à pelo menos um dos antimicrobianos testados, com multiresistência em 6% dos isolados. Noventa e sete por cento dos isolados apresentaram o gene *gelE*, no entanto 77% deles apresentaram atividade de gelatinase. A presença do gene *cyLLS* foi observado em 25% das cepas, no entanto, apenas 5% deles apresentaram atividade hemolítica. Nenhum dos isolados apresentaram atividade de lipase e DNase. Quinze por cento dos isolados possuem o gene *ccf*, 5% possuem o gene *cpd* e 3% possuem o gene *cob*. A capacidade de inibir bactérias patogênicas, assim como a baixa resistência aos antimicrobianos, a ausência de fatores de virulência apresentadas por algumas cepas de *Enterococcus faecalis* caracterizadas neste trabalho, as tornam promissoras para serem exploradas em outras aplicações, como probióticos na aquicultura.

**Palavras-chave:** alimentos, antagonismo, antimicrobianos, patogenicidade, potencial biotecnológico.

---

<sup>1</sup> Mestranda em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB/Embrapa Mandioca e Fruticultura: [escarneiro1@gmail.com](mailto:escarneiro1@gmail.com)

<sup>b</sup> Pesquisador pós-doutor, Núcleo de Estudos em Pesca e Aquicultura, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB: magalice@yahoo.com

<sup>c</sup> Professora adjunto, CCAAB, NEPA, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB: nsevangalista@yahoo.com

\*Autor para correspondência.

### Abstract

---

This study aimed to verify the virulence factors, antimicrobial susceptibility and antagonistic activity of *Enterococcus faecalis* strains isolated from bivalve molluscs and water of cultivation environment. Eighty-seven isolates were phenotypically and genotypically identified and subsequently subjected to the antagonism test, antimicrobial susceptibility to ampicillin, ciprofloxacin, gentamicin, imipenem, nitrofurantoin, tetracycline and vancomycin, as well as the identification of lipolytic, hemolytic and DNase activities and presence of genes, *gelE*, *cylL*, *cylS*, *ccf*, *cpd* and *cob*, encoding virulence determinants. Thirty seven percent of the isolates inhibited *Listeria monocytogenes* (CERELA), *Listeria innocuous* (CERELA), *Staphylococcus aureus* (ATCC25932), *Lactococcus lactis* (IL1403), *Micrococcus luteus* (ATCC10240) and *Enterococcus faecalis* (ATCC29212). All strains were susceptible to the antibiotic ampicillin, but 47% were resistant to at least one antimicrobial agent, and 6% of the isolates resented multidrug resistance. Ninety seven percent of the isolates contained *gelE* gene, however 77% of these isolates showed gelatinase activity. The presence of the *cylL* and *cylS* genes was observed in 25% of the isolates, however only 5% presented hemolytic activity. None of the isolates showed lipase and DNase activities. Eight percent of the isolates contained the *ccf* gene, 2% showed the presence of the *cpd* and *cob* genes. The ability to inhibit pathogenic bacteria, as well as the low resistance to antibiotics and the absence of virulence factors become some strains of *Enterococcus faecalis* characterized in this work promising to be explored in other applications such as probiotics in aquaculture.

**Key words:** Aquatic environment, Antagonism, *Enterococcus faecalis*, Molluscs.

### Introdução

As bactérias do ácido láctico (BALs) são um dos maiores grupos de bactérias industrialmente importantes. Pertencente a esse grupo *Enterococcus* sp. possui características tecnológicas e, quando utilizadas em processos fermentativos, contribuem para a maturação e o desenvolvimento do sabor em alguns produtos cárneos e queijos (OGIER; SERROR, 2008; BARBOSA et al., 2010).

A sua capacidade antagonista permite controlar o desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis nos alimentos (VALENZUELA et al., 2009).

Dentro do gênero *Enterococcus* as espécies *E. faecalis* e *E. faecium* são as mais importantes, uma vez que estas espécies são atualmente as únicas utilizadas na produção de probióticos destinados ao consumo humano e animal (FRANZ et al., 2011). Em alimentos, a sua aplicação tem sido limitada, uma vez que podem ser utilizados como indicadores de contaminação de origem fecal, além de algumas linhagens estarem relacionadas com infecções nosocomiais, síndromes diarréicas em recém nascidos e a resistência aos antimicrobianos (BILLSTROM et al., 2010; VALENZUELA et al., 2008; BARBOSA et al., 2010).

Por sobreviverem em ambientes com concentrações de sal de até 6,5%, pH entre 4,0 a 9,6 e temperaturas entre 10°C a 45°C, *Enterococcus* sp. podem facilmente ser isolados no solo, na água, em vegetais, intestino de humanos, animais, pescados, crustáceos (OGIER; SERROR, 2008; HAMMAD et al., 2014) e moluscos bivalves devido ao seu sistema de alimentação por filtração (MARTINES; OLIVEIRA, 2010).

As substâncias inibidoras produzidas por *Enterococcus* sp são de interesse na bioconservação de frutos do mar fermentados ou outros alimentos, bem como na sua utilização como culturas probióticas na aquicultura (VALENZUELA et al., 2010).

O desenvolvimento de probióticos isolados diretamente do trato digestivo dos organismos e da água ou a partir de ambientes impactados pela ação antropogênica tem sido eficaz devido à adaptação e capacidade de sobrevivência desses micro-organismos a esses ambientes (RESENDE, 2009), além de que é desejável que a espécie probiótica proposta tenha especificidade com a espécie hospedeira (RIBEIRO et al., 2008; FERREIRA et al., 2012).

Todavia, a incidência de fatores de virulência nas espécies do gênero *Enterococcus*, bem como a resistência antimicrobiana, tem contribuído em uma pré-seleção dos micro-organismos a serem utilizados como probióticos, sendo os fatores limitantes a resistência a vancomicina (CRUZ et al., 2012).

O conhecimento da capacidade antagonista associada ao perfil de resistência aos antimicrobianos e mecanismos de virulência em estirpes de *E. faecalis* pode ajudar a compreender a complexidade desses micro-organismos e seu potencial para aplicação na aquicultura. Nesta pesquisa, buscou-se gerar informações sobre o potencial biotecnológico dessas bactérias adaptada a condições do ambiente aquático e colonizadoras de tecidos de moluscos caracterizando os isolados quanto à presença de marcadores de virulência, de suscetibilidade a antimicrobianos e atividade antagonista.

## **Materiais e Métodos**

### *Micro-organismos, condições de crescimento e identificação fenotípica.*

As culturas de *Enterococcus* utilizadas neste estudo foram previamente isoladas a partir de água e dos moluscos bivalves, ostras e sururu, em áreas de extração no Recôncavo da Bahia, Brasil. Estas culturas foram mantidas a -20 °C em meio apropriado contendo 20% (v/v) de glicerol. Para a realização dos experimentos, as culturas foram previamente ativadas no caldo infusão cérebro e coração (BHI). Os microrganismos indicadores *Listeria monocytogenes* (CERELA), *Listeria innocua* (CERELA), *Staphylococcus aureus* (ATCC25932), *Lactococcus lactis* (IL1403), *Micrococcus luteus* (ATCC10240) e *Enterococcus faecalis* (ATCC29212) foram cultivados em caldo BHI.

Para a confirmação dos isolados foram realizados os seguintes testes bioquímicos: coloração de Gram, crescimento a 10°C e 45°C, crescimento na presença de 6,5% de NaCl, redução do telurito e fermentação de açúcares (arabinose, manitol, sorbitol e glicose com produção de gás) (KLEIN, 2003).

### *Identificação genotípica*

#### *1 Extração de DNA*

Os isolados foram cultivados *overnight* a 37°C em caldo infusão cérebro e coração (BHI) e centrifugado a 14.000 rpm por 3 minutos, a fim de se obter o precipitado celular (MANERO; BLANC, 2002). O DNA genômico foi extraído utilizando o Wizard® Genomic DNA Purification Kit.

#### *2 Amplificação e análise do DNA 16S*

Para a amplificação do DNA ribossomal 16S por reação em cadeia da polimerase (PCR) usando os primers universais para Enterobacteriaceae MD (5'CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCA) e FD (5'CCGAATTCGTGACAACAGAGTTTGATCCT) (WEISBURG et al., 1991) foram utilizadas as seguintes condições: um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 00h02, seguido de 30 ciclos a 95°C por 00h01, 58°C por 00h00m30, 72°C por 00h02, um ciclo a 72°C por 00h05 e 4°C por 00h10 (MANERO; BLANC, 2002). O sequenciamento dos fragmentos de DNA obtidos foi realizado pela empresa Macrogen. Após o sequenciamento foram realizadas as comparações de sequências nucleotídicas utilizando as sequências depositadas no GenBank.

### *Determinação da atividade antagonista*

Para a avaliação da atividade inibitória dos isolados inicialmente foi realizada uma triagem usando o teste *spot-on-the-lawn* como descrito por Harris et al.,(1989) em meio ágar BHI e incubados a 37°C por 24h00. Posteriormente, foi adicionado uma sobrecamada utilizando como culturas indicadoras *Listeria monocytogenes* (CERELA), *Listeria innocua* (CERELA), *Staphylococcus aureus* (ATCC25932), *Lactococcus lactis* (IL1403), *Micrococcus luteus* (ATCC10240) e *Enterococcus faecalis* (ATCC29212).

Os isolados que apresentaram atividade antagonista foram submetidos ao teste de *well-diffusion-agar*. O sobrenadante livre das células foi testado sob diferentes tratamentos: neutralizado em pH 7,0 a 100°C por 00h15, na presença de papaína, protease e proteinase K. Em todos os testes a formação de um halo claro indicava a inibição no crescimento (SCHILLINGER; LUCKE, 1989).

### *Suscetibilidade antimicrobiana e concentração inibitória mínima (CIM)*

A determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos ampicilina (30µg), ciprofloxacina (5µg), gentamicina (10µg), imipinem (10µg), nitrofurantoina (300µg), tetraciclina (30µg) e vancomicina (30µg) foi realizada pelo método de difusão de disco em ágar, seguido a metodologia descrita pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (2010).

A partir do cultivo em meio agar Infusão de cérebro e coração (BHI) a 37° C por 24h00, obteve-se um inóculo com concentração equivalente a 0,5 da escala McFarland ( $10^7 - 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) através da diluição do inóculo em 9mL de solução salina. Foi realizado o espalhamento da cultura em placas de agar Muller-Hinton com o auxílio de um *swab* estéril. Os discos impregnados com os antimicrobianos foram dispostos nas placas que foram incubadas a 37° C por 18h00. Os isolados foram definidos como sensíveis, intermediários ou resistentes de acordo com a leitura do diâmetro e comparado com os valores estabelecido pela tabela 2 para *Enterococcus* do CLSI (2010).

Para as cepas que apresentaram resistência aos antimicrobianos foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) utilizando a técnica de microdiluição em tubos a partir de cultivo bacteriano em meio agar BHI a 37° C por 24h00, obteve-se um inóculo com concentração equivalente a 0,5 da escala McFarland ( $10^7 - 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) através da diluição do inóculo em 9mL de solução salina, distribui-se 50 µL em tubos contendo 9mL de caldo Muller Hinton nas diversas concentrações do antimicrobiano estudado que foram incubadas a 37° C por 18h00. Os isolados foram definidos como sensíveis ou resistentes de acordo com a turvação do meio e comparação com os valores estabelecido pela tabela 2 para *Enterococcus* do CLSI (2010).

### Determinação dos fatores de virulência

Para a realização da verificação dos fatores de virulência as cepas foram previamente crescidas em caldo BHI a 37°C por 24h00. A investigação da atividade hemolítica foi realizada utilizando àgar TSA suplementado com 5% de sangue de carneiro e incubado a 37°C por 24h00. A presença de um halo claro em volta da colônia indicou atividade de  $\beta$ -hemólise (EATON; GASSON, 2001). Para o perfil gelatinolítico, as cepas foram inoculadas em placas de Petri contendo àgar TSA contendo 1% de NaCl suplementado com 0,5% de gelatina bacteriológica e incubadas a 37°C por 24h00.

A hidrólise da gelatina foi revelada por meio de uma solução saturada de sulfato de amônia, visualizada pela formação de um halo claro ao redor da microgota do inóculo (AUSTIN et al., 2005). A atividade de lipase foi verificada em meio àgar TSA contendo 1% de NaCl e 1% de Tween 80, com incubação a 37°C por 24h00. A reação positiva foi indicada pela formação de um halo claro ao redor das colônias (TIAGO et al., 2004). Para a verificação da atividade da enzima DNase utilizou-se o meio àgar DNase contendo 0.05% de azul de toluidina, incubado a 37°C por 24h00 (BEM OMAR et al., 2004).

### Determinação da presença de genes de virulência

A presença dos genes foi verificada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) usando os iniciadores mostrados na Tabela 1. A reação realizada nas seguintes condições: um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 00h01, seguido de 35 ciclos a 95°C por 00h00m15, 49,2° a 58°C por 00h00m30, 72°C por 00h01m30, um ciclo a 72°C por 00h10 e 4°C por 00h10 (BIRRI et al., 2013).

**Tabela 1.** Iniciadores para amplificação de fatores de virulência em *Enterococcus faecalis* isolados em amostras de água e moluscos bivalves.

Iniciador	Sequencia (5'- 3')	Tamanho do Amplicon (pb)	Referência
<i>gelE</i>	ACCCCGTATCATTGGTTT ACGCATTGCTTTTCCATC	419	(Eaton; Gasson, 2001)
<i>cylR<sub>LS</sub></i>	CAACAATTTTATGATGGAGGGT AA TCTTCCATGTAAGCACTCCTTTT	517	(Birri et al., 2013; Eaton e Gasson, 2001).
<i>Cpb</i>	TGGTGGGTTATTTTTCAATTC TACGGCTCTGGCTTACTA	782	(Eaton; Gasson, 2001)
<i>cob</i>	AACATTCAGCAAACAAAGC	1405	(Eaton; Gasson, 2001)

	TTGTCATAAAGAGTGGTCAT		
<i>Ccf</i>	GGGAATTGAGTAGTGAAGAAG	543	(Eaton; Gasson, 2001)
	AGCCGCTAAAATCGGTAAAAT		

Fonte: O autor

Para a análise das reações de amplificação foi utilizado gel de agarose na concentração de 1,0%, adicionado de 0,5 µg/ml de brometo de etídio. O tamanho dos fragmentos de DNA foram estimados com base nos padrões dos fragmentos do marcador Quick-Load® 100pb DNA Lader.

## Resultados e discussão

### *Identificação*

Das 87 estirpes de *Enterococcus* sp. utilizadas na identificação bioquímica e análise das sequências de rDNA 16S, 13 estirpes foram identificadas como *Lactococcus* sp, 3 foram identificadas como *E. durans* sp ou *E. hirae* sp, 11 não foi possível identificar e 60 estirpes foram identificadas como *E. faecalis* que foram selecionadas para a realização do estudo. Das 60 estipes 10 foram isoladas em amostras de água, 14 de ostras (*Crassostrea* sp) e 36 de sururu (*Mytella* sp).

Outros estudos também mostraram a ocorrência de bactérias do ácido lático (BAL) em frutos do mar como peixes, camarão, mariscos e surimi (CAMPOS et al., 2006), sendo *E. faecalis* a espécie dominante em peixes de varejo e produtos a base de peixe ponto para consumo no Japão, sugerindo que esses produtos são oriundos de ambientes aquáticos impactados (HAMMAD et al., 2014).

Mesmo sabendo que a área de isolamento dos micro-organismos é uma área que sofre com o aporte de esgotos domésticos, em virtude da falta de saneamento na região, e que a presença de *E. faecalis* está relacionada à presença de contaminação de origem fecal, a aquisição de cepas diretamente do ambiente de estudo tem sido indicada na escolha de bactérias com potencial aplicação probiótica, uma vez que estes dispõem de mecanismos que lhe conferem melhores condições de competição (CRUZ et al., 2012).

### *Capacidade antagonista*

Os micro-organismos são capazes de produzir várias substâncias inibidoras, tais como subprodutos do metabolismo que incluem o ácido lático, diacetil, peróxido de hidrogênio, agentes líticos, exotoxinas e também bacteriocinas (TAGG et al., 1976).

Do total de isolados testados, 22 (37%) apresentaram atividade inibidora. Desses, 82% (18/22) inibiram *L. lactis* (IL1403), 23% (5/22) apresentaram atividade anti-listerial, sendo que cinco isolados inibiram *L. innocua* (CERELA) e um isolado inibiu *L. monocytogenes* (CERELA), 18% (4/22) apresentaram atividade inibidora sobre *M. luteus* (ATCC10240), 18% (4/22) foram

capazes de inibir *E. faecalis* (ATCC29212) e 9% (2/22) inibiram *S. aureus* (ATCC25932) (Tabela 2).

A busca por culturas de *Enterococcus* produtoras de bacteriocinas vem ganhando interesse, pois estes podem ser utilizados no biocontrole de bactérias patogênicas como *L. monocytogenes* (Abriol et al., 2008). A produção de bacteriocinas em isolados provenientes de frutos do mar foi relatada por Valenzuela et al. (2010). Pinto et al. (2009) também relataram duas estirpes de BAL's (*Enterococcus* e *Pediococcus*) com propriedades antagônicas isoladas a partir de moluscos.

A fim de se obter um maior conhecimento a respeito da natureza das substâncias antagônicas produzidas, o sobrenadante livre de células foi testado. A atividade inibitória permaneceu em 76% (13/22) mesmo após passar pelos tratamentos com enzimas proteolíticas e neutralização do pH (pH 7).

Com base nos resultados não se pode afirmar a natureza do composto inibidor produzido, pois as características se apresentaram atípicas quando comparadas a outros estudos (CONCHA-MEYER et al., 2011), ou seja, o tratamento com enzimas proteolíticas geralmente promove a inativação das bacteriocinas por serem compostas por peptídeos (PINTO et al., 2009).

Todas as substâncias inibidoras foram consideradas termosensíveis, uma vez que perderam sua atividade após o tratamento a 100°C por 00h15. Geralmente, as bacteriocinas de enterococos são caracterizadas como termorresistentes, onde a perda da atividade do substrato estudado pode ser atribuída à presença de um peptídeo composto de uma fração termolábil (SCHÔBITZ et al., 2014).

A bacteriocina ST15, produzida por *Enterococcus mundtii*, também foi relatada por perder totalmente a atividade após tratamento com temperaturas de 90-121°C por 00h10 (DE KWAADSTENIET et al., 2005). Já as bacteriocinas descritas no estudo realizado por Pinto et al. (2009) perderam apenas parcialmente a atividade após o tratamento com diferentes temperaturas (90-120°C).

Nos últimos anos, o uso de bactérias de origem marinha e produtoras de substâncias inibidoras frente a bactérias patogênicas em sistemas de aquicultura (VALENZUELA et al., 2009) tem ganhado espaço na aquicultura como alternativa mais eficaz para garantir a saúde dos organismos do que a administração de antimicrobianos (CRUZ et al., 2012).

Na Tabela 2 pode-se observar que os isolados de água e sururu apresentaram resultados semelhantes quanto ao potencial antagônico, de maneira que foram capazes de inibir praticamente as mesmas culturas indicadoras, exceto *L. monocytogenes* (CERELA) que foi inibida apenas por um isolado de sururu. Também é possível visualizar que os isolados que apresentaram atividade hemolítica são provenientes dessas duas origens.

Esta semelhança pode se dá em virtude do ambiente aquático ser considerado altamente competitivo e adverso, bem como o sedimento onde o sururu se encontra enterrado conter alta concentração de células microbianas.

**Tabela 2.** Relação da resistência e virulência entre os de *Enterococcus faecalis* que apresentaram potencial antagonístico.

Perfis					
Origem	Código isolado	Antagonismo	Resistencia	Virulência	
				GENÓTIPO	FENÓTIPO
Água	EFA14	<i>LL, S A, ML</i>	TET	<i>gelE, cyl, ccf, cpd</i>	hem
	EFA16	<i>LI, EF</i>		<i>gelE, cob</i>	
	EFA18	<i>LI, EF</i>		<i>gelE, ccf</i>	
	EFA20	<i>LL, ML</i>	IMP*, TET	<i>gelE, cyl, cpd</i>	hem
	EFA21	<i>LI, LL</i>		<i>gelE, cyl, ccf, cpd</i>	
Ostra	EFOS26	<i>LL</i>	IMP	<i>gelE, cyl, cpd</i>	gel
	EFOS27	<i>LL</i>	VAN*, GEN*	<i>gelE, cyl, ccf</i>	gel
	EFOS28	<i>LL</i>	TET	<i>gelE, cyl</i>	gel
	EFOS29	<i>LL</i>	GEN*, GEN*	<i>gelE, cyl</i>	gel
	EFOS30	<i>LL</i>	VAN	<i>gelE, cyl</i>	gel
	EFOS31	<i>LL</i>	GEN*	<i>gelE, cyl</i>	gel
	EFOS33	<i>LL</i>		<i>gelE</i>	gel
	EFOS34	<i>LI</i>	GEN, IMP	<i>gelE</i>	gel
	EFOS35	<i>LL</i>		<i>gelE, cyl</i>	gel
Sururu	EFSU40	<i>LL</i>	CIP, GEN*	<i>gelE, cyl</i>	gel
	EFSU41	<i>LL</i>	GEN*	<i>gelE, cyl</i>	gel
	EFSU42	<i>ML, EF</i>	GEN	<i>gelE</i>	gel
	EFSU50	<i>LL</i>	CIP*, GEN, GEN,	<i>gelE</i>	gel, hem
	EFSU57	<i>LL</i>	VAN*	<i>gelE, cyl</i>	gel
	EFSUP64	<i>LM, LI, LL, S A, ML, EF</i>	GEN	<i>gelE, cyl</i>	gel
	EFSUP65	<i>LL</i>	GEN*	<i>gelE</i>	gel
	EFSUP84	<i>LL</i>	GEN*	<i>gelE</i>	gel
EFSUP87	<i>LL</i>	GEN	<i>gelE</i>	gel	

Fonte: O autor.

LM - *Listeria monocytogenes* (CERELA), LI - *Listeria innocua* (CERELA), LL - *Lactococcus lactis* (IL1403), SA - *Staphylococcus aureus* (ATCC25932), ML - *Micrococcus luteus* (ATCC10240), EF - *Enterococcus faecalis* (ATCC29212) CIP – ciprofloxacina, GEN – gentamicina, TET – tetraciclina, IMP – imipenem, VAN – vancomicina, \* - indica resistência intermediária, gem – perfil gelatinolítico, hem – perfil hemolítico.

#### Perfil de suscetibilidade antimicrobiana

Todos os isolados apresentaram sensibilidade apenas a ampicilina, seguido da nitrofurantoina (98%). A resistência a pelo menos um dos agentes antimicrobianos foi observada em 47% dos isolados, embora cepas com elevada resistência intermediária tenha sido observado em 70% dos isolados (Tabela 3).

**Tabela 3.** Suscetibilidade antimicrobiana e concentração inibitória mínima (CIM) de *Enterococcus faecalis* isolados em amostras de água e moluscos bivalves.

Antimicrobianos	% de suscetibilidade / numero de isolados			CIM (µg)
	Sensível	Intermediário	Resistente	
Aminoglicosídeo				
<i>Gentamicina</i> (10µg)	35 <sub>(21/60)</sub>	40 <sub>(24/60)</sub>	25 <sub>(15/60)</sub>	60µg
β – lactâmico				
<i>Ampicilina</i> (30µg)	100 <sub>(60/60)</sub>	0	0	0
<i>Imipenem</i> (10µg)	82 <sub>(49/50)</sub>	10 <sub>(6/60)</sub>	8 <sub>(5/60)</sub>	50µg
Glicopeptídeo				
<i>Vancomicina</i> (30µg)	90 <sub>(54/60)</sub>	7 <sub>(4/60)</sub>	2 <sub>(1/60)</sub>	70µg
Nitrofurânico				
<i>Nitrofurantoina</i> (300µg)	98 <sub>(59/60)</sub>	2 <sub>(1/60)</sub>	0	0
Quinolona				
<i>Ciprofloxacina</i> (5µg)	92 <sub>(55/60)</sub>	6 <sub>(4/60)</sub>	2 <sub>(1/60)</sub>	20µg
Tetraciclina				
<i>Tetraciclina</i> (30µg)	85 <sub>(51/60)</sub>	5 <sub>(3/60)</sub>	10 <sub>(6/50)</sub>	80µg

Fonte: O autor

A resistência de *Enterococcus* sp. aos antimicrobianos pode ser resultado da necessidade de sobreviver e persistir em ambientes altamente competitivos (BIRRI et al., 2013). O estudo da resistência aos agentes antimicrobianos em micro-organismos aquáticos indica o grau de extensão da alteração dos ecossistemas pela ação do homem, principalmente quando os antimicrobianos são

liberados nos esgotos pela urina, fezes e eventualmente carcaças de animais (BAQUERO et al., 2008).

A presença de compostos antimicrobianos em ambientes aquáticos é preocupante, pois mesmo que estejam presentes em baixas concentrações é considerado um risco aos ecossistemas, por interferirem nos processos biológicos (HUERTA et al., 2013). O ambiente aquático é considerado o nicho mais eficiente na troca de material genético entre os micro-organismos devido à presença de elementos móveis como plasmídeos e transposons. Esta troca favorece o surgimento de bactérias patogênicas e multirresistentes aos antimicrobianos (EVANGELISTA-BARRETO et al., 2012).

A maior resistência foi observada para a gentamicina e a tetraciclina. Multiresistência foi verificada em apenas 6% (3/60) dos isolados, sendo 2% (1/60) resistentes ao imipenem e a tetraciclina, 2% (1/60) a gentamicina e a tetraciclina e 2% (1/60) a gentamicina e imipenem. De acordo com Zheng et al. (2011) pesquisas acerca da incidência de múltipla resistência aos antimicrobianos em bactérias isoladas de ambientes aquáticos é importante para ampliar os conhecimentos sobre essas estirpes, o consumo de antimicrobianos, e seus efeitos sobre os organismos cultivados, bem como em doenças humana.

Segundo a literatura os fenótipos de resistência mais importantes são aqueles relacionados com os aminoglicosídeos, betalactâmicos e glicopeptídeos por serem utilizados no tratamento de infecções causadas por *Enterococcus*. Apesar do gênero ser descrito como resistente a baixos níveis de aminoglicosídeos e tetraciclina em isolados de origem clínica, a alta frequência de resistência à gentamicina vem sendo relatada em várias cepas isoladas de alimentos e água mundialmente (OLIVEIRA; PINHATA, 2008; MACEDO et al., 2011; HAMMAD et al., 2014).

As estirpes resistentes à vancomicina estão emergindo como uma ameaça global à saúde pública, porém, no presente estudo, apenas um isolado apresentou perfil de resistência e 7% (4/60) foram classificados com resistência intermediária, não sendo indicadas para a aplicação biotecnológica (Tabela 3). O uso de antimicrobianos com sensibilidade intermediária, faz seleção as cepas resistentes (CARVALHO et al., 2009).

Geralmente os enterococos possuem resistência intrínseca à vancomicina devido às alterações na síntese da parede celular. A resistência à vancomicina é fator limitante para seu uso como probiótico (KLEIN, 2003; OGIER; SERROR, 2008).

A determinação da concentração inibitória mínima dos isolados resistentes foi considerada baixa quando comparada aos limites estabelecidos pelo CLSI (2010), ou seja, a maior CIM (excedendo 5 vezes o limite) foi verificada para a ciprofloxacina e a tetraciclina, enquanto a menor CIM (excedendo 2 vezes o limite) foi obtida para a vancomicina (Tabela 3).

*Enterococcus* sp. possuem vários mecanismos de resistência que podem ser intrínsecos ou adquiridos. A resistência adquirida ocorre pela transferência de genes presentes em plasmídeos pela

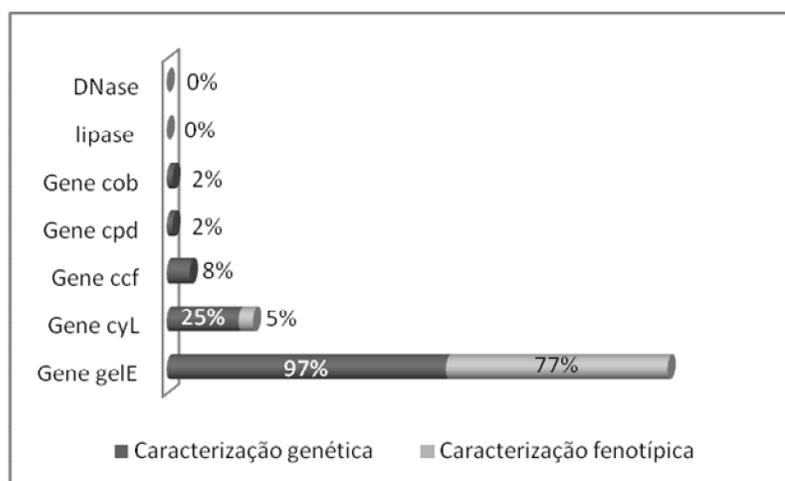
conjugação de bactérias intra e interespecífica (ARCIOLA et al., 2008). Os agentes antimicrobianos de uso animal e humano ao serem lançados no ambiente aquático alteram o equilíbrio ecológico (REGINATO; LEAL, 2010) aumentando a incidência de bactérias resistentes nos ambientes aquáticos e em frutos do mar. Embora, os índices de transferência de resistência em alimentos e ambientes aquáticos sejam menores que os índices clínicos (CRUZ et al., 2012) o acúmulo de micro-organismos nos tecidos dos moluscos pode facilitar essa transferência.

Culturas de *Enterococcus* resistentes podem ser introduzidas na cadeia alimentar e no intestino humano, promovendo a transferência de fatores de resistência entre as bactérias da microflora intestinal (KLEIN, 2003). Desta maneira para a utilização segura de *E. faecalis* resistentes como culturas probióticas é importante ter certeza que esses fatores de resistência não são transferíveis (CRUZ et al., 2012).

#### *Fatores de virulência*

A análise genética mostrou que 97% dos isolados possuem o gene estrutural *gelE* responsável pela produção da enzima gelatinase em *E. faecalis*, entretanto, atividade gelatinolítica foi observada em apenas 77% dos isolados. Nenhum dos isolados foi positivo para os testes de lipase e DNase (Figura 1).

**Figura 1.** Perfil da presença de genes relacionados à patogenicidade em culturas de *Enterococcus faecalis* isoladas em amostras de água e moluscos bivalves.



Fonte: O autor

*Enterococcus* sp. são capazes de produzir algumas proteases que os ajudam a sobreviver no meio onde vivem sendo produzidas apenas quando necessárias (PARK et al., 2007). A gelatinase é uma metaloprotease que hidrolisa a gelatina, o colágeno, a hemoglobina e outros peptídeos

bioativos. Apesar dessa enzima estar relacionada com a indução de processos inflamatórios e produção de biofilme (GOMES et al., 2008; WANG et al., 2011; CORMELATO et al., 2013) sua ação proteolítica é considerada vantajosa para indústria (VALENZUELA et al., 2010).

Estes resultados são corroborados por Birri et al., (2013) ao estudarem o perfil gelatinolítico em bactérias do gênero *Enterococcus* e relataram maior prevalência na espécie *E. faecalis* do que em outras espécies do mesmo gênero. Comerlato et al., (2013) comparando a atividade de gelatinase em isolados de *E. faecium* e *E. faecalis* também verificaram uma maior presença do gene *gelE* em *E. faecalis*. Ainda de acordo com os autores isolados que apresentavam o gene *gelE* não foram capazes de degradar a gelatina implicando na falta de expressão gênica.

Apesar de 25% dos isolados conterem o gene *cyLL<sub>S</sub>* codificador da citolisina, apenas 5% apresentaram atividade hemolítica (Figura 1). A produção de citolisina se deve a um operon composto por oito genes, principalmente o gene *cylA*, pois sem ele a expressão no gene estrutural *cyLL<sub>S</sub>* não ocorre (BIRRI et al., 2013). O gene estrutural *CyLL<sub>S</sub>* não parece ser uma característica exclusiva em isolados de amostras clínica, uma vez que pode ser detectado nas mais diversas amostras estudadas, como solo, água e alimentos (BILLSTROM et al., 2008).

A citolisina é um peptídeo exclusivo do gênero *Enterococcus* que possui atividade inibitória contra bactérias Gram-positivas, codificado pelo gene estrutural *CyLL<sub>S</sub>* geralmente localizado em plasmídeo. Este gene também é responsável por causar hemólise em humanos (BARBOSA et al., 2010). Linhagens que expressam esta proteína apresentam 10 vezes mais patogenicidade. Este fator contribui para sua proliferação na corrente sanguínea visto que sua atividade se dá sobre a lise de hemácias, macrófagos e neutrófilos (GOMES et al., 2008).

A atividade hemolítica não está apenas relacionada a presença do gene *cylA*, tendo que ser levado em consideração outros fatores como o ambiente e a presença de outros genes integrantes do operon (BIRRI et al., 2013).

No estudo realizado com cepas de *E. faecium* isoladas de frutos do mar não foi verificada atividade hemolítica e presença do gene *cylA* (VALENZUELA et al., 2010), no entanto, Valenzuela et al. (2008) relataram que em 17% de *E. faecalis* que continham o gene *cylA* isolados de alimentos de origem vegetal e animal, não havia atividade hemolítica, corroborando com nossos resultados.

Os genes responsáveis pela codificação dos quimiorreceptores estavam presentes em 8% (4/60), 2% (1/60) e 2% (1/60) dos isolados para os genes *ccf*, *cpd* e *cob*, respectivamente (Figura 1).

Estes genes podem promover a aquisição de resistência aos antimicrobianos, fatores de virulência e outras características a partir de estirpes de *Enterococcus* sp. (22), por meio da formação de agregados celulares. Os feromônios medeiam à conjugação facilitando a troca de informações genéticas (EATON; GASSON, 2001).

Considerando a baixa incidência dos genes *ccf*, *cpd* e *cob*, estes não são uma preocupação para a utilização segura das cepas de *E. faecalis* (VALENZUELA et al., 2010).

Os fatores ambientais podem influenciar a expressão gênica dos micro-organismos, fazendo com que alguns genes silenciosos tornam-se ativos pelas mudanças no ambiente, assim como as condições encontradas no trato gastrointestinal do hospedeiro (EATON; GASSON, 2001; WANG et al., 2011).

A presença de um gene específico não significa a expressão fenotípica do mesmo, conforme relatado para *E. faecalis* isolados de diversas fontes incluindo água e alimentos (EATON; GASSON, 2001; ARCIOLA et al., 2008; BILLSTROM et al., 2008; GOMES et al., 2008; BARBOSA et al., 2010; WANG et al., 2011; BIRRI et al., 2013; CORMELATO et al., 2013).

A atividade hemolítica serve como indicador do potencial de patogenicidade em *Enterococcus* sp. sendo este um fator limitante para a sua utilização como probióticos e/ou como culturas *starter* em alimentos. O potencial probiótico dos *E. faecalis* poderá ser explorado de forma segura em 13% dos isolados estudados, pois estes não apresentam resistência a vancomicina e perfil hemolítico.

## **Conclusão**

A atividade inibitória apresentada pelos isolados de *E. faecalis* gera expectativas quanto à exploração do seu potencial biotecnológico, principalmente, quando se pensa em micro-organismos com potencial probiótico para a aquicultura. Dos isolados investigados, 13% não apresentaram fatores relacionados a patogenicidade, assim o seu potencial probiótico pode ser investigado para aplicação na aquicultura.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem a CAPES e a colaboração do professor Dr. Jorge Teodoro de Souza (laboratório de Genética de Micro-organismos), a professora Dr<sup>a</sup>. Soraia Fonteles (laboratório de Ictiogenética), ao pesquisador Dr. Emanuel Felipe Medeiros Abreu (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) e a toda a equipe do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental.

## **Referências**

ABRIOUEL, H.; OMAR, N. B.; MOLINOS, A. C.; LÓPEZ, R. L.; GRANDE, M. J.; MARTÍNEZ-VIEDMA, P.; ORTEGA, E.; CAÑAMERO, M. M.; GALVEZ, A. Comparative analysis of genestic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable food, water and soil, and clinical samples. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 123, p. 38-49, 2008.

ARCIOLA, C. R.; BALDASSARRI, L.; CAMPOCCIA, D.; CRETÌ, R.; PIRINI, V.; HUEBNER, J.; MONTANARO, L. Strong biofilm production, antibiotic multi-resistance and high gelE expression in epidemic clones of *Enterococcus faecalis* from orthopaedic implant infections. *Biomaterials*, Surrey, v. 20, p. 580-586, 2008.

AUSTIN, A.; AUSTIN, D.; SUTHERLAND, R.; THOMPSON, F.; SWINGS, J. Pathogenicity of vibrios to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and *Artemia nauplii*. *Environmental Microbiology*, Washington, v. 7, n. 9, p. 1488–1495, 2005.

BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J. L.; CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, London, v. 19, n. 3, p. 260-265, 2008.

BARBOSA, J.; GIBBS, P.A.; TEIXEIRA, P. virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal. *Food Control*, Guildford, v. 21, p. 651-656, 2010.

BEILLSTROM, H.; LUND, B.; SULLIVAN, A.; NORD, C. E. Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Oxford, v. 32, p. 374-377, 2008.

BEN OMAR, N.; CASTRO, A.; LUCAS, R.; ABRIOUEL, H.; YOUSIF, N. M. K.; FRANZ, C. M. A.P.; HOLZAPFEL, W. H.; PÉREZ-PULIDO, R.; MARTÍNEZ-CANÁMERO, M.; GÁLVEZ, A. Functional and safety aspects of enterococci isolated from different Spanish foods. *Systematic and Applied Microbiology*, Stuttgart, v. 27, n. 118-130, 2004.

BIRRI, D. J.; BREDE, D. A.; TESSEMA, G. T.; NES, I. F. Bacteriocin production, antibiotic susceptibility and prevalence of haemolytic and gelatinase activity in faecal lactic acid bacteria isolated from healthy ethiopian infants. *Microbial Ecology*, New York, v. 65, p. 504-516, 2013.

CARVALHO, F, C.T.; EVANGELISTA-BARRETO, N. S.; REIS, C. M. F.; HOFER, E.; VIEIRA, R. H. F. Susceptibilidade antimicrobiana de *Salmonella* spp. isolade de fazendas de carcinicultura do estado do Ceará. *Revista Ciência Agronômica*, Fortaleza, v. 40, n. 4, p. 549-556, 2009.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing. Twentieth Informational Supplement, M100-S20. Wayne, PA: CLSI, 2010.

COMERLATO, C. B.; DE RESENDE, M. C. C.; CAIERÃO, J.; D'AZEVEDO, P. A. Presence of virulence factors in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* susceptible and resistant to vancomycin. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 108, n. 5, p. 590-595, 2013.

CONCHA-MEYER, A.; SCHÖBITZ, R.; BRITO, C.; FUENTES, R. Lactic acid bacteria in an alginate film inhibit *Listeria monocytogenes* growth on smoked salmon. *Food Control*, Guildford, v. 22, p. 485-489, 2011.

CORIOLATO, D.; ANDRIGHETTO, C.; LOMBARDI, A. Occurrence of virulence factors and antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from dairy and human sample in North Italy. *Food Control*, Guildford, v. 19, p. 886-892, 2008.

CRUZ, P. M.; IBÁÑES, A. L.; HERMOSILLO, O. A. M.; SAAD, H. C. R. Use of probiotics in aquaculture. *International Scholarly Research Network*, Cairo p. 1-13, 2012.

DE KWAADSTENIET, M.; TODOROV, S.D.; KNOETZE, H.; DICKS, L.M.T. Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 105, p. 433-444, 2005.

EATON, T. J.; GASSON, M. J. Molecular Screening of *Enterococcus* Virulence Determinants and Potential for Genetic Exchange between Food and Medical Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 67, n. 4, p. 1628-1635, 2001.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S.; CARVALHO, F. C. T.; MENEZES, F. G. R.; SILVA, C. M.; ROCHA, R. S.; SOUSA, O. V.; FERMANDES-VIERIA, R. H. S. Bathing suitability and antimicrobial susceptibility of *Enterococcus* in tropical coastal waters. *Arquivos de Ciências do Mar*, Fortaleza, v. 45, n. 1, p. 62-68, 2012.

FERREIRA, A. H. C.; ARARIPE, M. N. B. A.; MONTEIRO, C. A. B.; LOPES, J. B.; ARARIPE, H. G. A. A. Uso de probióticos na aquicultura – Revisão. *Revista Eletrônica Nutritime*, São Paulo, v. 9, n. 5, p. 1965-1980, 2012.

FRANZ, C. M. A. P.; HUCH, M.; ABRIOUEL, H.; HOLZAPFEL, W.; GÁLVEZ, A. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 151, p. 125-140, 2011.

GOMES, B.C.; ESTEVES, C. T.; PALAZZO, I. C. V.; DARINI, A. L. C.; FELIS, G. E.; SECHI, L. A.; FRANCO, B. D. G. M.; DE MARTINIS, E. C. P. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. Isolados from Brazilian foods. *Food Microbiology*, London, v. 25, p. 666-675, 2008.

GÚTIEZ, L.; GÓMEZ-SALA, B.; RECIO, I.; DEL CAMPO, R.; CINTAS, L. M.; HERRANZ, C.; HERNÁNDEZ, P. E. *Enterococcus faecalis* strains from food, environmental, and clinical origin produce ACE-inhibitory peptides and other bioactive peptides during growth in bovine skim milk. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 166, p. 93-101, 2013.

HAMMAD, A. M.; SHIMAMOTO, T.; SHIMAMOTO, T. Genetic characterization of antibiotic resistance and virulence factors in *Enterococcus* spp. from Japanese retail ready-to-eat raw fish. *Food Microbiology*, London, v. 38, p. 62-66, 2014

HARRIS, L. J.; DAESCHEL, M. A.; STILES, M. E.; KLAENHAMMER, T.R. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 52, n. 6, p. 384-387, 1989.

HUERTA, B.; MARTI, E.; GROS, M.; LÓPEZ, P.; POMPÊO, M.; ARMENGOL, J.; BARCELÓ, D.; BALCÁZAR, J. L.; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S.; MARCÉ, R. Exploring the links between antibiotic occurrence, antibiotic resistance, and bacterial communities in water supply reservoirs. *Science of the Total Environment*, Amsterdam, v. 456-457, p. 161-170, 2013.

KLEIN, G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastrointestinal tract. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 88, p. 123-131, 2003.

MACEDO, A. S.; FREITAS, A. R.; ABREU, C.; MACHADO, E.; PEIXE, L.; SOUSA, J. C.; NOVAIS, C. Characterization of antibiotic resistant enterococci isolated from untreated waters for human consumption in Portugal. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 145, p. 315-319, 2011.

- MANERO, A.; BLANCH, A. R. Identification of *Enterococcus* spp. based on specific hybridisation with 16S rDNA probes. *Journal of Microbiological Methods*, Amsterdam, v. 50, p. 115-121, 2002.
- MARTINES, D. I.; OLIVEIRA, A. J. F. C. Faecal bacteria in *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (Mollusca: bivalvia) for biomonitoring coastal Waters and seafood quality. *Brazilian Journal of Oceanography*, São Paulo, v. 58, p. 29-35, 2010.
- OGIER, J. C.; SERROR, P. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *International Journal Food Microbiology*, Amsterdam, v. 126, p. 291-301, 2008.
- OLIVEIRA, A. J. F. C.; PINHATA, J. M. W. Antimicrobial resistance and species composition of *Enterococcus* spp. isolated from waters and sands of marine recreational beaches in Southeastern Brazil. *Water Research*, New York, v. 42, p. 2242-2250, 2008.
- PARK, S. Y.; KIM, K. M.; LEE, J. H.; SEO, S. J.; LEE, I. H. Extracellular gelatinase of *Enterococcus faecalis* destroys a defense system in insect hemolymph and human serum. *Infection and Immunity*, Washington, v. 74, n. 4, p. 1861-189, 2007.
- PINTO, A.L.; FERNANDES, M.; PINTO, C.; ALBANO, H.; CASTILHO, F.; TEIXEIRA, P.; GIBBS, P. A. Characterization of anti-listeria bacteriocins isolated from shellfish: potential antimicrobials to control non-fermented seafood. *International journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 129, p. 50-58, 2009.
- REGITANO, J. B.; LEAL, R. M. P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 34, p. 601-616, 2010.
- RESENDE, E. K. Pesquisa em rede em aquicultura: bases tecnológicas para o desenvolvimento sustentável da aquicultura no Brasil. *Aquabrazil. Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 38, p. 52-57, 2009.
- RIBEIRO, P. A. R.; COSTA, L. S.; LAGARTO, P. V. R. Probióticos na aquicultura. *Revista Eletronica Nutritime*, São Paulo, v. 5, n. 1, p. 837-846, 2008.
- SCHILLINGER, U.; LUCKE, F.K. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied Environment Microbiology*, Washington, v. 55, n. 8, p. 1901-1906, 1989.

SCHÔBITZ, R.; GONZÁLEZ, C.; VILLARREAL, K.; HORZELLA, M.; NAHUELQUÍN, Y.; FUENTES, R. A. Biocontroller to eliminate *Listeria monocytogenes* from the food processing environment. *Food Control*, Guildford, v. 36, p. 217-223, 2014.

TAGG, J. R.; DAJANI, A. S.; WANNAMAKER, L. W. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriological Reviews*, Baltimore, v. 40, n. 3, p. 722-756, 1976.

TIAGO, I.; TEIXEIRA, I.; SILVA, S.; CHUNG, P.; VERÍSSIMO, A.; MANAIA, C. M. Metabolic and genetic diversity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from composted municipal sludge on poly- $\epsilon$ -caprolactones. *Current Microbiology*, New York, v. 49, p. 407-414, 2004.

VALENZUELA, A. S.; OMAR, N. B.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R. L.; ORTEGA, E.; CAÑAMERO, M. M.; GÁLVEZ, A. Risk factors in enterococci isolated from foods in Morocco: determination of antimicrobial resistance and incidence of virulence factors. *Food and Chemical Toxicology*, Oxford, v. 46, p. 2648-2652, 2008.

VALENZUELA, A. S.; OMAR, N. B.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R. L.; VELJOVIC, K.; CAÑAMERO, M. M.; TOPISIROVIC, M. K. L.; GÁLVEZ, A. Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. *Food Control*, Guildford, v. 20, p. 381-385, 2009.

VALENZUELA, A. S.; BENOMAR, N.; ABRIOUEL, H.; CAÑAMERO, M. M.; GÁLVEZ, A. Isolation and identification of *Enterococcus faecium* from seafoods: Antimicrobial resistance and production of bacteriocin-like substances. *Food Microbiology*, London, v. 27, p. 955-961, 2010.

WANG, L.; DONG, M.; ZHENG, J.; SONG, Q.; YIN, W.; LI, J.; NIU, W. Relationship of biofilm formation and gelE gene expression in *Enterococcus faecalis* recovered from root canals in patients requiring endodontic retreatment. *Clinical Research*, Thorofare, v. 37, n. 5, p. 631-636, 2011.

WEISBURG, W. G., BARNS, S. M., PELLETIER, D. A. & LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 173, p. 697-703, 1991.

ZHENG, S.; QIU, X.; CHEN, B.; YU, X.; LIU, Z.; ZHONG, G.; LI, H.; CHEN, M.; SUN, G.; HUANG, H.; YU, W.; FREESTONE, D. Antibiotics pollution in jiulong river estuary: source, distribution and bacterial resistance. *Chemosphere*, Oxford, v. 84, p. 1677-1685, 2011.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo demonstra que a utilização de bactérias lácticas isoladas a partir de áreas impactadas é possível tanto na produção de alimentos como probiótico sendo de grande importância na aquisição e produção de alimentos saudáveis e seguros ao consumo humano e animal. Mostrando o grande potencial biotecnológico dos micro-organismos presentes no ambiente que ainda é pouco explorado.

Além disso, os dados obtidos nesta pesquisa podem servir como base para testes futuros onde as espécies de *E. faecalis* testadas poderão ser utilizadas para realização de testes específicos como verificação do potencial tecnológico, a caracterização e utilização das substâncias antagônicas, bem como sua atuação como probiótico na aquacultura. Estes testes deverão ter por objetivo confirmar se o poder inibitório do teste *in vitro* se repete no sistema de cultivo além de apresentar outras características que são atribuídas aos probióticos.