

***Enterococcus faecium* EF137V: uma nova fonte estratégica para o controle da saúde humana e animal contra espécies de *Campylobacter***

***Enterococcus faecium* EF137V: a new strategic source for the control of human and animal health against *Campylobacter* species**

***Enterococcus faecium* EF137V: una nueva fuente estratégica para el control de la salud humana y animal contra especies de *Campylobacter***

Recebido: 28/09/2020 | Revisado: 04/10/2020 | Aceito: 05/10/2020 | Publicado: 06/10/2020

**Priscilla Régia de Andrade Calaça**

ORCID: <https://orcid.org/0000000190926832>

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil

E-mail: [priscilla.acalaca@ufrpe.br](mailto:priscilla.acalaca@ufrpe.br)

**Elaine Cristina da Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0000000323957166>

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil

E-mail: [nane.bio22@gmail.com](mailto:nane.bio22@gmail.com)

**Felipe Pereira de Melo**

ORCID: <https://orcid.org/0000000204780345>

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil

E-mail: [phelipe16\\_2010@hotmail.com](mailto:phelipe16_2010@hotmail.com)

**Dayane da Silva Santos**

ORCID: <https://orcid.org/0000000183247858>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: [santos.dhay08@gmail.com](mailto:santos.dhay08@gmail.com)

**Ana Beatriz Lins Aragão**

ORCID: <https://orcid.org/0000000204408535>

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil

E-mail: [beatrizaragao27@gmail.com](mailto:beatrizaragao27@gmail.com)

**Pablo Eugênio da Costa e Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0000000230349460>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: pabloecs@hotmail.com

**Mércia Rodrigues Barros**

ORCID: <https://orcid.org/0000000334499164>

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil

E-mail: mercia.barros@ufrpe.br

**Ana Lúcia Figueiredo Porto**

ORCID: <https://orcid.org/0000000155615158>

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil

E-mail: analuporto@yahoo.com.br

**Maria Taciana Holanda Cavalcanti**

ORCID: <https://orcid.org/0000000195736296>

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil

E-mail: maria.vsoares@ufrpe.br

## **Resumo**

O probiótico está relacionado a um suplemento alimentar, enquanto que os produtos vivos bioterapêuticos - PVBs são considerados medicamentos biológicos, ambos contêm microorganismos vivos com substâncias ativas e que beneficiam o hospedeiro. O *Enterococcus faecium* apresenta muitas propriedades interessantes e funcionais para saúde humana e animal, entre elas a capacidade antimicrobiana, que ajuda em doenças de intoxicação alimentar como a Campilobacteriose. As espécies *Campylobacter jejuni* e *C. coli*, têm sido descritas neste contexto. Portanto, pela necessidade de desenvolver alternativas que permitam garantir a segurança dos produtos consumidos pela população, este trabalho propõe uma estratégia complementar para reduzir ou eliminar o *Campylobacter* por meio do uso de *Enterococcus faecium* EF137V, isolado de queijo “Coalho” artesanal de Pernambuco-Brasil. As análises foram realizadas *in vitro*. Dadas as condições adversas, como pH ácido e presença de sais biliares, nas quais EF137V foi exposto, verificou-se que a bactéria apresentou resistência a condições gastrointestinais, aderência às células epiteliais, atividade antimicrobiana pelos seus compostos metabólicos contra cepas de referência de *C. jejuni* e *C. coli*, bem como atividade antagonista, o que sugere que ambas as espécies não serão capazes de crescer desordenadamente na microbiota intestinal do hospedeiro, podendo assim controlar a esses microorganismos na comunidade bacteriana em frangos de corte e evitando novas infecções em humanos. Pode-se concluir que o EF137V é um PVB e probiótico promissor, apresentando grande capacidade para aplicações de biotecnologia.

**Palavras-chave:** Probióticos; *Enterococcus faecium*; *Campylobacter jejuni*; *Campylobacter coli*; Biotecnologia.

### Abstract

The probiotic is related to a food supplement, while the live biotherapeutic products - LBPs are considered biological medicines, both contain living microorganisms with active substances that benefit the host. *Enterococcus faecium* has many interesting and functional properties for human and animal health, including the antimicrobial capacity, which helps in food poisoning diseases such as Campylobacteriosis. *Campylobacter jejuni* and *C. coli* species have been described in this context. Therefore, due to the need to develop alternatives to ensure the safety of products consumed by the population, this work proposes a complementary strategy to reduce or eliminate Campylobacter through the use of *Enterococcus faecium* EF137V, isolated from artisanal “Coalho” cheese from Pernambuco-Brazil. The analyzes were performed *in vitro*. Given the adverse conditions, such as acid pH and the presence of bile salts, in which EF137V was exposed, it was found that the bacteria showed resistance to gastrointestinal conditions, adherence to epithelial cells, antimicrobial activity by its metabolic compounds against reference strains of *C. jejuni* and *C. coli*, as well as antagonistic activity, which suggests that both species will not be able to grow disorderly in the host's intestinal microbiota, thus being able to control these microorganisms in the bacterial community in broilers and preventing new infections in humans. It can be concluded that the EF137V is a promising PVB and probiotic, presenting great capacity for biotechnology applications.

**Keywords:** Probiotics; *Enterococcus faecium*; *Campylobacter jejuni*; *Campylobacter coli*; Biothechnology.

### Resumen

El probiótico está relacionado con un complemento alimenticio, mientras que los productos bioterapéuticos vivos, los PBV se consideran medicamentos biológicos, ambos contienen microorganismos vivos con sustancias activas que benefician al huésped. *Enterococcus faecium* tiene muchas propiedades interesantes y funcionales para la salud humana y animal, incluida la capacidad antimicrobiana, que ayuda en enfermedades de intoxicación alimentaria como la campilobacteriosis. En este contexto se han descrito especies de *Campylobacter jejuni* y *C. coli*. Por lo tanto, ante la necesidad de desarrollar alternativas para asegurar la inocuidad de los productos consumidos por la población, este trabajo propone una estrategia

complementaria para reducir o eliminar *Campylobacter* mediante el uso de *Enterococcus faecium* EF137V, aislado de queso “Coalho” artesanal de Pernambuco-Brasil. Los análisis se realizaron *in vitro*. Dadas las condiciones adversas, como pH ácido y presencia de sales biliares, en las que se expuso EF137V, se encontró que la bacteria presentaba resistencia a afecciones gastrointestinales, adherencia a células epiteliales, actividad antimicrobiana por sus compuestos metabólicos frente a cepas de referencia de *C. jejuni* y *C. coli*, así como actividad antagónica, lo que sugiere que ambas especies no podrán crecer desordenadamente en la microbiota intestinal del hospedador, pudiendo así controlar estos microorganismos en la comunidad bacteriana en pollos de engorde y prevenir nuevas infecciones en humanos. Se puede concluir que el EF137V es un PVB y probiótico prometedor, presentando gran capacidad para aplicaciones biotecnológicas.

**Palabras clave:** Probióticos; *Enterococcus faecium*; *Campylobacter jejuni*; *Campylobacter coli*; Biotecnología.

## 1. Introdução

As espécies do gênero *Campylobacter*, tem sido destaque no contexto de infecção alimentar, por serem agentes causadores da campilobacteriose, considerada uma importante gastroenterite que acomete os humanos, configurando entre as principais causas globais de doenças diarreicas, cuja a incidência e a prevalência vêm aumentando nos últimos dez anos (Calazans, et al. 2020). Embora a maioria desses casos ocorra como gastroenterite autolimitante, os casos mais graves e de longa duração podem exigir tratamento com antibióticos, principalmente em pacientes imunocomprometidos (Ma, et al., 2014).

Uma das mais importantes fontes de transmissão de campilobacteriose humana é o consumo de produtos de origem avícola, uma vez que as aves são reservatórios naturais de espécies de *Campylobacter* (Lima, et al., 2020). A preocupação com esse micro-organismo baseia-se nos índices observados no Brasil e em outros países da América do Norte, Europa e Japão onde as taxas de contaminação de frangos de corte e subprodutos pós processamento variam de 8 a 100% (Peres, 2020), entretanto, esses dados podem variar dependendo do consumo de frangos por região (Garcia, et al., 2020).

A campilobacteriose em seres humanos deve-se principalmente ao *Campylobacter jejuni*, com cerca de 90% dos casos, sendo a porção restante causada predominantemente por *Campylobacter coli* (Torres, Hass & Siqueira, 2016). A redução da colonização intestinal por *Campylobacter* em frangos de corte é uma importante estratégia para reduzir o patógeno e,

consequentemente, o risco para desencadeamento da doença pelo consumo de carne contaminada (Calazans, et al., 2020). Alternativas para o controle e redução do micro-organismo, abordando ações de biossegurança e estratégias nutricionais como combinações probióticas e até bacteriocinas (posbóticos), é um verdadeiro desafio devido ao seu comportamento, principalmente comensal, no intestino dessas aves (Meunier, et al., 2015; Calazans, et al., 2020).

Existem, portanto, duas problemáticas: 1) a desordem gastrointestinal causada em adultos e crianças pela contaminação por *Campylobacter* e 2) a colonização intestinal por *C. jejuni* e *C. coli* em frangos de corte, tornando-se, consequentemente, o principal agente de transmissão da campilobacteriose em humanos. Diante de duas demandas importantes na agropecuária e na saúde é que se faz necessário um olhar atento sobre os produtos vivos bioterapêuticos – PVBs e os probióticos para o estabelecimento e equilíbrio da saúde humana e animal (Ross, et al., 2008; Calazans, et al. 2020).

Alguns produtos contendo membros de diversos gêneros de micro-organismos podem ser desenvolvidos como PVBs que são administrados com a intenção de tratar ou prevenir doenças, dentre estas, as importantes infecções e/ou inflamações intestinais (Ross, et al., 2008; FDA, 2016). Os probióticos, por sua vez, são culturas vivas de organismos benéficos que estimulam seletivamente o crescimento de bactérias nativas no intestino, beneficiando assim o hospedeiro (Asha & Gayathry, 2012).

Embora os PVBs e probióticos pareçam semelhantes em suas denominações, existem diferenças regulatórias bem definidas para ambos no campo de suas atuações. O probiótico está relacionado a um suplemento alimentar, enquanto que os PVBs são considerados produtos farmacêuticos (medicamentos biológicos) contendo micro-organismos vivos com substâncias ativas (Simmons, et al., 2020).

Um gênero importante que pode englobar as duas características terapêuticas é a *Enterococcus*, conhecida pela sua aplicação na segurança dos alimentos, agregando valor à prevenção e ao tratamento contra infecções de origem alimentar, devido à sua capacidade de produzir uma variedade de compostos, entre eles os antimicrobianos (Cleveland, et al., 2001; Cocolin, et al., 2007; Franz, et al., 2011; Chakchouk-Mtibaa, et al., 2014; Favaro, et al., 2014; Sonsa-Ard, et al., 2015).

Historicamente, os *Enterococcus* são habitantes predominantemente de intestinos de humanos e outros animais. Certas especificidades do hospedeiro podem ser observadas, como por exemplo, a *Enterococcus faecium* que é a espécie de ocorrência mais frequente em frangos saudáveis (Christofoli, et al., 2020). Neste sentido, a manutenção dessas boas

bactérias no intestino das aves pode ser possível através da adição de espécies probióticas na ração que fornecem carboidratos fermentáveis e determinados compostos que favorecem, seletivamente, a multiplicação dos micro-organismos naturais benéficos do trato gastrointestinal do hospedeiro podendo substituir os antibióticos nas rações sem perdas de desempenho (Reis & Vieites, 2019).

Em particular, a *Enterococcus faecium*, exibe muitas propriedades bioquímicas e biotecnológicas interessantes, tais como atividades proteolíticas, lipolíticas, esterolíticas e outras atividades enzimáticas, utilização de citrato e produção de metabólitos (Rehaïem, et al, 2014), além de apresentar capacidade antagonista que permite o controle de bactérias indesejáveis na microbiota. Em trabalho realizado por Carvalho (2007) sobre a avaliação da atividade antagonista frente a *Listeria spp.*, foi verificado que as culturas de *Enterococcus* apresentaram maior poder de inibição, sendo a atividade antimicrobiana associada principalmente à produção de posbióticos (enterocinas).

As cepas de *Enterococcus faecium* têm promovido efeitos diversos a saúde, como a modulação da microbiota intestinal, melhora nos sintomas relacionados à colite ulcerativa (Cavallini, et al., 2017) e diminuição da incidência de diarreia (Pajarillo, et al., 2015). Entretanto, efeitos benéficos da *Enterococcus* no controle do crescimento dos patógenos *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* tem sido pouco relatado (Vahjen & Männer, 2014; Bratz, et al., 2015).

Numa experiência de co-cultura, o crescimento de *C. jejuni* foi altamente inibido por *E. faecium* e a alimentação de uma preparação probiótica incluindo *E. faecium* demonstrou reduzir a colonização de *C. jejuni* em galinhas (Bratz, et al., 2015).

Sendo assim, este estudo teve por objetivo determinar o potencial efeito antagonista e antimicrobiano da *Enterococcus faecium* EF137V isolada de queijo de Coalho artesanal de Pernambuco – Brasil sobre a inibição do crescimento *in vitro* da *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*.

## **2. Metodologia**

### **2.1 Micro-organismos e condições de cultivo**

O produto vivo bioterapêutico *Enterococcus faecium* 137V (EF137V) foi isolado de queijo de Coalho artesanal do agreste de Pernambuco, Brasil e cultivado em caldo de Man,

Rogosa e Sharpe - MRS (Himedia, M369) a 37 °C em aerobiose por 24h, para posterior obtenção de posbióticos.

Os agentes indicadores *Campylobacter jejuni* IAL e *Campylobacter coli* ATCC 33291 foram cultivados em mCCDA (modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar) (Himedia, M887) suplementado com Cefoperazona e Anfotericina B (Himedia, FD135). As culturas foram incubadas em condições de microaerofilia a 42°C durante um período de 48 horas (ISO 10272-1 2006).

## **2.2 Resistência ao valor de pH baixo**

Foi realizada de acordo com Argyri, et al. (2012), com a cultura EF137V após 18 horas de crescimento em caldo MRS, ajustada para 10<sup>8</sup> UFC/mL. A cultura foi centrifugada (10.000 xg, 5 minutos, 4°C), lavada duas vezes com tampão fosfato salino (PBS 1M) (pH 7,2). Logo após, foi ressuspensa em solução PBS com pH ajustado para 2,5, incubadas a 37°C por 0, 1 e 3 horas. A seguir, a resistência e a viabilidade da colônia foi analisada a partir do crescimento em MRS ágar com incubação à 37°C por 24 horas. O experimento foi realizado em duplicata. O número de células viáveis foi expresso em log UFC/mL<sup>-1</sup>.

## **2.3 Resistência à presença de sais de bile**

Foi realizada de acordo com Argyri, et al. (2012), com a cultura EF137V após 18 horas de crescimento em caldo MRS, ajustada para 10<sup>8</sup> UFC/mL. A cultura foi centrifugada (10.000 xg, 5 minutos, 4°C), lavada duas vezes com tampão fosfato salino (PBS 1M) (pH 7,2), ressuspensa em solução PBS ajustado para pH 8,0, contendo 0,5% (peso/volume) de sais de bile (Himedia<sup>®</sup>), incubação a 37°C por 0, 2 e 4 horas, A resistência e a viabilidade da colônia foi analisada pelo crescimento em MRS ágar à 37°C por 24h. O experimento foi realizado em duplicata. O número de células viáveis foi expresso em log UFC/mL<sup>-1</sup>.

## **2.4 Adesão microbiana a solventes (MATS)**

A EF137V foi testada quanto a adesão intercelular em solvente descrito por Kos, et al. (2003) como um experimento capaz de simular a capacidade de adesão celular *in vitro*.

A EF137V foi inoculada em caldo MRS, retirada na fase estacionária com aproximadamente  $10^8$  UFC/mL e centrifugada a 5.000 xg por 15 min. As células obtidas foram lavadas duas vezes com PBS 1M (7,2), e ressuspensas com  $\text{KNO}_3$  (pH 6,2), e a absorbância da suspensão celular foi mensurada a 600 nm ( $A_0$ ). Em seguida, adicionou-se 1 mL do solvente xilol (Vetec Ltda.) para 3 mL da suspensão celular. Após 10 minutos de pré-incubação à temperatura ambiente, as duas fases foram removidas por agitação em vortex por 2 minutos. A fase aquosa foi removida depois de 20 minutos de incubação à temperatura ambiente e a absorbância de 600 nm ( $A_1$ ) foi mensurada. O cálculo da porcentagem da adesão da bactéria ao solvente foi:

$$\text{Eq. (1): MATS: } (1-A_1/A_0) \times 100$$

Neste teste, o microrganismo que apresentam adesão ao solvente acima de 70% são classificados como alta, entre 50 e 70% classificados como moderada, e abaixo de 50% são classificados como baixa hidrofobicidade. A alta hidrofobicidade tem sido sugerido como indicador para boa capacidade adesiva (Rosenberg, Gutnick & Rosenberg, 1980). Os resultados obtidos foram as médias das triplicatas.

## 2.5 Adesão de BAL às células epiteliais *in vitro*

A adesão da EF137V às células epiteliais *in vitro* foi realizada em células obtidas a partir do intestino delgado de camundongos da linhagem Swiss albino de acordo com a metodologia descrita por Alwan, et al. (1998) e sob autorização do Comitê de Ética no Uso Animal – CEUA (licença ceua-ufpe: 23076.017009/2012-13). Onde, cortes de tecido intestinal com aproximadamente 7 cm foram retirados através de cirurgia, fendas foram abertas para a lavagem da parte interna das secções com PBS 1M (pH 7,2) frio, a seguir esses pedaços de tecido foram incubados a 37 °C em PBS 1M contendo EDTA 10 mM sob agitação (15 rpm – em média). Após 20 minutos de incubação, as secções foram lavadas novamente em PBS para remoção do EDTA. As células epiteliais foram desalojadas esfregando as amostras do intestino com um êmbolo de seringa estéril. O sobrenadante rico em célula epitelial foi drenado para outro tubo e lavado duas vezes com PBS. Os enterócitos recolhidos foram ressuspensos em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Sigma-Aldrich®) e 10% de glicerol. Em seguida, as células foram estocadas à -80°C até a sua utilização para análise da capacidade de adesão das BAL.

A metodologia de avaliação da capacidade adesiva da bactéria EF137V às células epiteliais foi conforme Alwan, et al. (1998) e Laheinen, et al. (2010). Onde, 1 mL da cultura da bactéria ( $1,0 \times 10^8$  UFC/mL) foi homogeneizada com 1 mL de células epiteliais ( $10^6$  células/mL), obtidas como descrito acima. Em seguida, foram incubadas por 60 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Após incubação, as células foram centrifugadas a 100 xg por 10 minutos; lavadas duas vezes para remoção de bactérias não aderidas e ressuspensas em 5 mL de PBS (pH 7,2). A seguir foram centrifugadas a 100 xg por 10 minutos com a finalidade de preparar as lâminas de microscópio utilizando 500  $\mu\text{L}$  da suspensão. As lâminas foram secas à temperatura ambiente, sendo posteriormente coradas através da coloração de Gram para leitura em microscopia óptica com ampliação de 1000x, a fim de visualizar as bactérias aderidas às células epiteliais. A análise foi repetida três vezes.

## 2.6 Avaliação da atividade antagonista

A EF137V foi selecionada para a determinação do efeito contra os agentes indicadores *Campylobacter jejuni* IAL e *Campylobacter coli* ATCC 33291. As bactérias indicadoras testadas foram cultivadas em caldo infusão cérebro coração (BHI) e incubada a  $42^\circ\text{C}$  por 48 horas em condições microaerofilia, ajustadas para uma concentração de  $10^7$  UFC/mL.

Para o cultivo da EF137V foi utilizado o caldo MRS, incubando-se a  $37^\circ\text{C}$  por 24h. Após o crescimento,  $5\mu\text{L}$  do cultivo foi colocado sob a superfície de discos de papel esterilizados em uma placa de Petri contendo ágar MRS, e incubados a  $37^\circ\text{C}$ , durante 24 horas. A seguir,  $3,5\text{mL}$  de ágar semissólido contendo as bactérias *Campylobacter jejuni* IAL e *C. coli* ATCC 33291 recém-cultivadas em caldo BHI foi adicionado às placas previamente cultivadas com a EF137V. Estas foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$ , durante 48 horas, sob observação a cada 24 horas. As zonas de inibição em torno dos discos de papel foram registradas conforme as metodologias de Guedes Neto, et al. (2005) e Thirabunyanon & Thongwittaya (2012).

## 2.7 Teste de resistência a antibióticos

O teste de resistência a antibióticos foi realizado de acordo com as normas do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2003) utilizando a metodologia de disco-difusão. A concentração celular da EF137V foi ajustada para uma concentração de  $10^8$  UFC/mL. Os discos de antibióticos utilizados foram Rifampicina (RIF) 5  $\mu\text{g}$ , Tetraciclina (TET) 30  $\mu\text{g}$ , Penicilina (PEN) 10U, Ciprofloxacina (CIP) 5  $\mu\text{g}$ , Estreptomicina (EST) 10  $\mu\text{g}$ , Cefalexina

(CEF) 30 µg, Ampicilina (AMP) 10 µg e Gentamicina (GEN) 10 µg. As distâncias entre um disco e outro foi de aproximadamente 30mm, impedindo a superposição dos halos de inibição.

Após 24 horas de incubação, as placas foram examinadas a fim de verificar o crescimento. Os diâmetros dos halos de inibição foram analisados de acordo com os critérios de interpretação preconizados pelo CLSI (2003).

## 2.8 Isolamento do posbiótico

Para o fim de isolar o posbiótico, a partir do processo de produção pelo crescimento microbiano da EF137V, a amostra foi centrifugada a 6.500 rpm por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante livre de células foi ajustado para o pH 6,0 com 6M de NaOH para prevenir o efeito inibitório do ácido lático e tratado termicamente a 80 °C, em banho de ebulição por 10 min. Em seguida, os posbióticos foram precipitados com saturação de 0%-60% de sulfato de amônio. O precipitado foi ressuscitado em 20 ml de acetato de amônio (25 Mm, pH 6,5) (Todorov & Dicks, 2005; Todorov, et al., 2010). Para o fim da caracterização, o nível da atividade antimicrobiana foi determinado pelo teste contra *Campylobacter jejuni* IAL e *C. coli* ATCC 33291.

## 2.9 Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi determinada através do método da Concentração Mínima Inibitória (CMI) contra *Campylobacter jejuni* IAL e *C. coli* ATCC 33291, segundo NCCLS (2013). Cada suspensão foi realizada em duplicata, com repetições para contraprovas, utilizando o meio caldo Muller Hinton. Em seguida, o posbiótico foi adicionado em placas de 96 poços, numa concentração de 500, 250, 125, 100, 62.5, 50, 31.25, 25, 15.25, 12.5 e 6.25 mg/mL.

Após incubação a 37 °C por 24 horas, as placas foram submetidas a leitura em espectrofotômetro numa densidade óptica de 595 nm. As percentagens de inibição do crescimento em diferentes concentrações de posbiótico para cada microrganismo foram calculadas de acordo com Gudiña, et al. (2010), como:

$$\text{Eq. (2): Inibição de crescimento: } [1 - (A_c/A_0)] \times 100$$

Onde, Ac representa a absorvância do poço com uma concentração de posbiótico e A0 a absorvância do poço de controle (sem posbiótico). O resultado representa a porcentagem de células microbianas que a substância testada foi capaz de inibir em 90%.

Para confirmação dos achados quantitativos, foram realizadas leituras com o revelador Resazurin na concentração de 100 µg/mL, em que 30µL foram adicionados em cada poço da microplaca com o CMI. Após 2 horas de incubação em câmara escura foi avaliada a ausência do crescimento microbiano, representado pela cor azul e a presença do crescimento, pela cor rosa (Palomino, et al., 2002).

## **2.10 Identificação molecular**

A identificação molecular da EF137V foi realizada no Laboratório STABVIDA, Ltda. Portugal. A bactéria foi submetida aos seguintes procedimentos: a) Purificação de DNA de cultura de células armazenadas em FTA™ Indicador Micro Card; b) Amplificação por PCR de um segmento do 16S rDNA contendo genes das regiões variáveis V1 to V9; c) Sequenciamento de DNA Sanger (sentido e anti-sentido) dos produtos amplificados; d) Alinhamento de sequências para gerar a sequência de consenso; e) BLAST da sequência de consenso através do banco de dados no NCBI.

## **3. Resultados**

### **3.1 Identificação molecular**

Para uma melhor identificação do micro-organismo isolado e caracterizado parcialmente quanto ao desempenho dos seus critérios de funcionalidade para probióticos e PVBs, a bactéria EF137V, que obteve bons desempenhos nas atividades, foi submetida à identificação molecular. As espécies sugeridas de cada sequência de consenso BLASTed contra base de dados de nucleotídeos NCBI evidenciaram 99% de identificação para *Enterococcus faecium*. As sequências obtidas a partir do sequenciamento estão exibidas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Sequências obtidas a partir de dados gerados por sequenciamento da bactéria EF137V.

Microrganismo	Sequências de bases do DNA
<i>Enterococcus faecium</i> EF137V	CAGGACGAACGCTGGCGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTC CACCGGAAAAAGAGGAGTGCGGAACGGGTGAGTAAACAGTGGGTAACCTGCCATCAGAAGGGGATA ACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTGAAAGGCGTTT CGGGTGTGCTGATGGATGGACCCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGGGTAACGGCTACCAAGGCCA CGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCTACGG GAGGCAGCAGTAGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGA AGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGAC GGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGTGGCAAGCGT TGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGGCGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGCTC AACCGGGGAGGGTATTGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCATGTGTA GCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGACG CTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAG TGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGTGTCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGT ACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGTGGAGCATGTGGTTTAA TTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGTCTTGACATCCTTGACCACTTAGAGATAGAGCTTCCCC TTCGGGGCAAAGTGCAGAGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC CGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCGGTTGA CAAACCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCT ACAATGGGAAGTACAACGAGTYGCGAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTAGTTC GGATTGCAGCTGCAACTCGCTGCATGAAGCCGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCCGG TGAATACGTTCCGGGCTTGTACACACCGCCGTCACACCAGAGATTGTTAAACCCGAAGTCCGGT GAGGTAA

Fonte: Os autores.

### 3.2 Resistência a valores de pH baixo e à presença de sais biliares

A sobrevivência da EF137V foi estudada simulando as condições do trato gastrointestinal quanto ao pH baixo e à presença de sais biliares, e os resultados estão apresentados na Tabela 2. Observa-se que o pH 2,5, o que simula as condições ácidas do estômago, reduziu o número de células viáveis do microrganismo. Um resultado esperado, já que nesse pH existe naturalmente uma dificuldade da maioria das bactérias em se manter viáveis. A EF137V apresentou crescimento maior que 3 log UFC/mL de viabilidade na contagem após 1 hora de exposição à acidez, representado por  $2,1 \times 10^3$  UFC/mL, com população final de 2,7 log UFC/mL até 3 horas de exposição nas mesmas condições.

A mesma cultura submetida ao estresse ácido estomacal simulado foi avaliada quanto ao crescimento na presença de sais de bile, caracterizando um ambiente intestinal. A população da EF137V foi mantida até o final de 4 horas de exposição com redução insignificante das contagens viáveis, registrando 6,3 log UFC/mL, o equivalente a  $2,0 \times 10^6$  UFC/mL. Assim, podemos concluir que a EF137V também exibiu eficiência na sobrevivência as condições simuladas do intestino.

**Tabela 2.** Efeito simulado das condições do suco gástrico simulado em pH 2,5 e intestino em pH 8,0 (ajustado com 0,5% de sais de bile) sobre viabilidade da EF137V durante a incubação de 0 a 4 horas.

Microorganismo	Contagem final Log UFC/mL <sup>-1</sup>				
	0h	1h	2h	3h	4h
EF137V	2,7 <sup>(G)*</sup> - 5,3 <sup>(I)**</sup>	3,3 <sup>(G)</sup>	5,0 <sup>(I)</sup>	2,7 <sup>(G)</sup>	6,3 <sup>(I)</sup>

\* (G) Efeito simulado das condições do suco gástrico

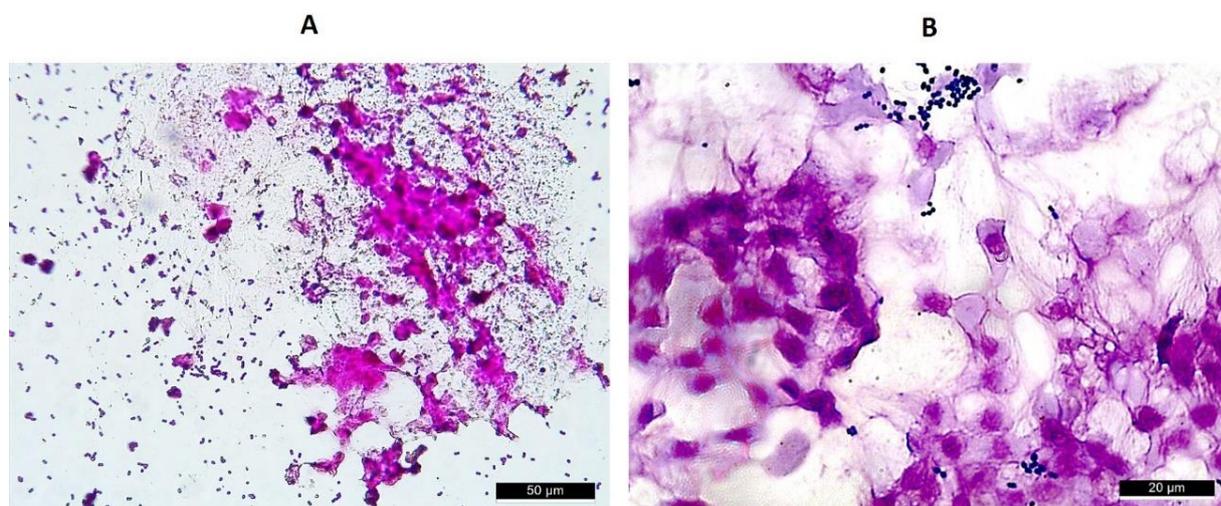
\*\* (I) Efeito simulado das condições do intestino

Fonte: Os autores.

### 3.3 Adesão microbiana a solventes (MATS) e as células epiteliais

A bactéria EF137V apresentou aderência à superfície das células epiteliais, como mostra a Figura 1. Tal resultado corrobora com a adesão ao solvente em que a EF137V apresentou 51,95% de moderada adesividade.

**Figura 1.** Análise de microscopia óptica (A- 40x; B- 100x) da adesão *in vitro* da EF137V às células epiteliais extraídas do intestino delgado de camundongos da linhagem Swiss albino coradas com Gram.



Fonte: Os autores.

### 3.4 Potencial antagonico

Os resultados mostraram o efeito antagonista da EF137V contra os microrganismos *Campylobacter jejuni* IAL e *C. coli* ATCC 33291, sendo positiva apresentando halos de inibição de 8,2 e 6,7 mm, respectivamente.

### 3.5 Avaliação da resistência a antibióticos

No presente estudo, a EF137V analisada apresentou sensibilidade para a maioria dos antibióticos testados de acordo com a Tabela 3. A EF137V resistiu a ação do Penicilina 10U, Estreptomicina 10µg e Gentamicina 10µg.

**Tabela 3.** Diâmetro do halo da sensibilidade ou resistência a antibióticos de EF137V.

Microrganismo	Antibióticos							
	Diâmetro do halo (mm)							
	RIF 5 µg	TET 30 µg	PEN 10U	CIP 5 µg	EST 10 µg	CEF 30 µg	AMP 10 µg	GEN 10 µg
EF137V	I	I	R	I	R	S	S	R

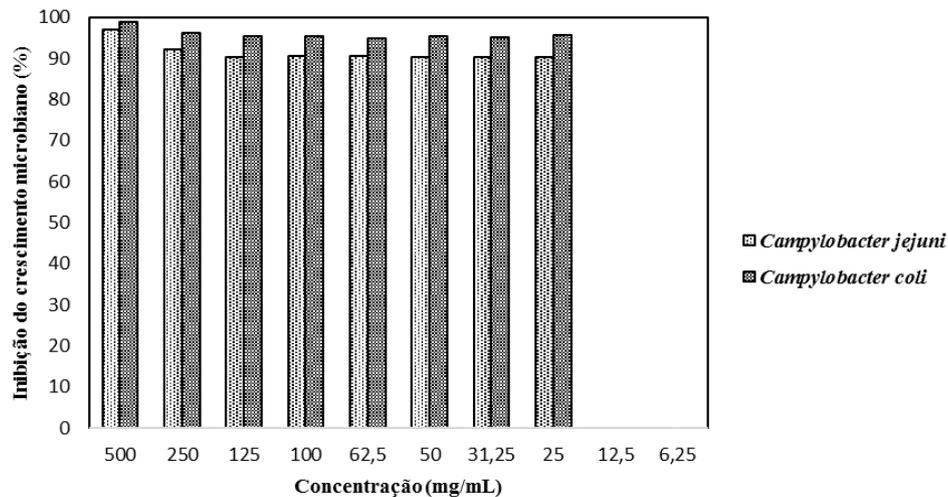
RIF, Rifampicina; TET, Tetraciclina; PEN, Penicilina; CIP, Ciprofloxacina; EST, Estreptomicina; CEF, Cefalexina; AMP, Ampicilina; GEN, Gentamicina. S=Sensível; I=Intermediário; R=Resistente.

Fonte: Os autores.

### 3.6 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana do probiótico produzido pela bactéria EF137V apresentou capacidade de inibir o crescimento das cepas de referência de *C. jejuni* e *C. coli* entre 90 a 100% nas concentrações entre 500 mg/mL a 25 mg/mL, como mostra a Figura 2, mostrando-se eficaz no controle destes microrganismos indicadores de patogenicidade e importantes nas infecções do trato gastrointestinal. Os dados qualitativos utilizados com o revelador químico Resazurin pode confirmar os achados quantitativos.

**Figura 2.** Inibição do crescimento dos micro-organismos indicadores *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* frente ao posbiótico produzido por EF137V.



Fonte: Os autores.

#### 4. Discussão

De acordo com os critérios funcionais para produtos vivos bioterapêuticos a EF137V pode estar a caminho das especificações de um produto com viabilidade terapêutica, igualmente às suas funcionalidades probióticas, uma vez que apresenta requisitos necessários para ação e manutenção, conforme os testes *in vitro* puderam evidenciar e descritos nas Tabelas 1, 2 e 3, bem como nas Figuras 1 e 2.

O ensaio de sobrevivência sob condições adversas do trato gastrointestinal em que a EF137V foi submetida se destaca devido ao seu potencial para elucidar um possível comportamento bacteriano nas condições ácidas e na presença dos sais de bile (Maragkoudakis, et al., 2006).

Aproximadamente 2,5 litros de suco gástrico e 1 litro de bile são secretados dentro do trato digestivo humano todos os dias. Portanto, é essencial que as bactérias tenham um sistema de proteção para suportar o baixo pH do estômago, ou seja, devem ser tolerantes ao pH 3 ou, pelo menos, tolerantes ao pH 4 – que é o pH da camada de muco gástrico (García, et al., 2017) – e depois às enzimas digestivas e aos sais biliares no intestino delgado devendo chegar íntegras até o final do percurso (Argyri, et al., 2012).

A bactéria EF137V avaliada neste estudo apresentou resistência adequada de acordo com a literatura entre 3 – 8 log UFC/mL (Das, Khowala & Biswas, 2016; Santos, et al., 2016; Abushelaibi, et al., 2017; Plessas, et al., 2017). Tal comportamento são propriedades

desejáveis em espécies bacterianas para serem consideradas como um PVB ou probiótico devido às condições de estresse encontradas no trato gastrointestinal. Com referência aos dados encontrados nas Tabelas 1 e 2 a EF137V mostra-se viável para colonizar a região do estômago e intestino a fim de exercer o seu papel biológico.

Além da resistência ao pH baixo, outro pré-requisito importante é a adesividade da EF137V às células epiteliais do intestino para que ocorra uma colonização temporária de cepas no trato gastrointestinal – impedindo a sua eliminação imediata pelos movimentos peristálticos e proporcionando uma vantagem competitiva neste ecossistema (Kos, et al., 2003), o que impedirá o crescimento patológico de microrganismos capazes de causar doenças incapacitantes, como a *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*. Entretanto, o conhecimento sobre os processos de adesão ao epitélio intestinal é escasso, apesar do desenvolvimento de vários métodos de reconhecimento das propriedades hidrofóbicas de microrganismos (Krasowska & Sigler, 2014). A cepa analisada EF137V apresentou resultados satisfatório quanto à sua atividade adesiva, apresentando >50% de adesão ao solvente.

A mesma bactéria aderiu de forma variada às células epiteliais de intestino de camundongo. A adesão à mucosa intestinal com células *in vitro*, tem sido considerada uma ferramenta no rastreamento de pré-requisitos para avaliar as propriedades adesivas de novas bactérias com potencial ação biológica (Chen, et al., 2014). *Lactobacillus* com mais de 15 células aderidas por célula epitelial foram consideradas positivas no estudo de Kumar & Kumar (2015). Resultados semelhantes foram obtidos no presente trabalho, a EF137V demonstrou propriedades de aderência comparáveis às bactérias *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Portanto, tal efeito é uma característica importante que pode direcionar a EF137V positivamente aos critérios de seleção quanto a um produto vivo bioterapêuticos, como também para um possível uso probiótico.

Em relação à resistência aos antimicrobianos, sabe-se que são uma das principais ferramentas utilizadas pela indústria médica para combater patógenos (Thirabunyanon, et al. 2013). A EF137V mostrou-se susceptível a maioria dos antibióticos avaliados, embora resistente para Estreptomicina e Gentamicina. Argyri, et al., (2012) sugerem um determinado cuidado ao fazer uso de bactérias resistentes aos antibióticos específicos, pois podem transferir resistência para agentes patogênicos intestinais.

É possível que a EF137V apresente resistência intrínseca aos antibióticos aminoglicosídeos testados – o que não prejudicaria o hospedeiro ao fazer uso da mesma – sendo benéfica no sentido de minimizar os efeitos adversos que os antibióticos podem apresentar contra a microbiota intestinal, como mostram os estudos de Coppola, et al. (2005),

Argyri, et al. (2012), Monteagudo-Mera, et al. (2012) e Morrow, et al. (2012) com cepas de *Lactobacillus*.

No estudo de Santos, et al., (2020), no qual foi analisado o genoma completo (cromossomo e plasmídeos), genes de resistência à vancomicina (*vanA* e *vanB*) e tetraciclina estavam presentes apenas em cepas de *Enterococcus faecium* em isolados hospitalar e relacionados a complicações clínicas. A EF137V, em contrapartida, apresentou apenas genes de resistência a antibióticos intrínsecos das bactérias lácteas.

É importante salientar que a bactéria EF137V foi isolada de queijo de Coalho artesanal e, provavelmente, não apresenta patogenicidade, diferentemente de *Enterococcus faecium* de origem nosocomial, como destaca o trabalho de Santos, et al. (2020). No estudo de Goh & Philip (2015) a cepa *Enterococcus faecium* isolada de leite fermentado mostrou que a sequência do genoma da bactéria confirmou que a cepa não possuía fator de virulência significativo e não era resistente à vancomicina – o que a tornava segura para ser utilizada como produto bioterapêutico – assim como os metabólitos de sua fermentação.

Estudos revelam a utilização de espécies de *Enterococcus* como culturas protetoras, por produzirem várias substâncias antagonistas que agem no controle ou na inibição do desenvolvimento de diversos microrganismos patogênicos (Giraffa, 2002). A capacidade antagonista desse tipo de microrganismo deve-se à produção de compostos formados em pequenas quantidades a partir do catabolismo celular, como os ácidos orgânicos (ácido láctico), peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, acetaldeído e substâncias antimicrobianas de natureza proteica (Naidu, et al., 1999).

Contudo, a atividade antagonista da *Enterococcus* frente a micro-organismos patogênicos irá variar de acordo com a espécie trabalhada e com a espécie do patógeno. No presente estudo, a utilização de um cultivo *Enterococcus faecium* EF137V foi capaz de inibir o crescimento de *C. jejuni* e *C. coli*, com a formação de halos de inibição de 8,2 e 6,7mm.

Chaveerach, et. al. (2004) isolando cepas de *Enterococcus spp.* de produtos lácteos (queijo), sem diferenciação de espécie, não obtiveram efeito algum ao testar a atividade antagonista frente a cepas de *Campylobacter*. Contudo, a mesma equipe ao isolar cepas de *Enterococcus* da microbiota de galinhas adultas saudáveis obtiveram inibição no crescimento de *C. jejuni* e *C.coli*. Os halos de inibição obtidos e mensurados para espécies de *Campylobacter* variaram entre 6,5 mm e 10 mm, logo, a mensuração dos halos do presente estudo, confluem com o intervalo obtido pelos autores.

O uso de produtos bacterianos ou metabólitos continua sendo uma opção terapêutica importante, ainda que amplamente inexplorada, para prevenir diversas doenças (Patel &

Denning, 2013). Os posbióticos, também conhecido como metabióticos, biogênicos, ou simplesmente metabólitos/sobrenadante livre de células; refere-se a fatores solúveis (produtos ou subprodutos metabólicos) secretados por bactérias vivas ou liberados após a lise bacteriana. Esses subprodutos oferecem benefícios fisiológicos ao hospedeiro, fornecendo bioatividade adicional (Aguilar-taolá, et al., 2018); evitando o risco de administrar microorganismos vivos em indivíduos com barreiras intestinais imaturas ou defesas imunológicas debilitadas podendo ser usado como um substituto terapêutico mais controlável e seguro (Patel & Denning, 2013).

Os posbióticos apresentam atividade antimicrobiana que pode ser atribuída à presença de vários compostos antimicrobianos com propriedades bacteriostáticas ou bactericidas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Kareem, et al., 2014). Neste estudo o posbiótico isolado da EF137V inibiu o desenvolvimento das cepas de *C. coli* e *C. jejuni* exibindo eficácia frente a concentrações distintas, como mostra a Figura 2. O posbiótico na concentração de 500 a 25mg/ml exibiu uma diferença em sua eficácia inferior a 8%, logo, a sua administração na concentração mínima de 25mg/ml já exibe efeito inibitório similar as concentrações elevadas também testadas.

## 5. Considerações Finais

*Enterococcus faecium* EF137V é promissora a pertencer ao grupo dos produtos vivos bioterapêuticos e probióticos, por apresentar importante eficácia antimicrobiana contra *Campylobacter jejuni* e *coli* em teste *in vitro*, portanto, pode vir a ser uma alternativa para a seguridade na indústria de alimentos no controle da população de *Campylobacter* em intestino de frangos de corte e, na indústria farmacêutica, no combate à infecções intestinais causadas pelos patógenos. A EF137V se destaca por seu amplo potencial em futuras aplicações biotecnológicas, nutracêuticas e farmacológicas, entretanto, vale salientar que estudos *in vivo* são necessários. Caracterizando-se como uma fase importante e determinante para evidenciar os efeitos da cepa bacteriana testada a nível fisiológico e sistêmico, o que diferencia do estudo *in vitro*, em que as análises são controladas e particionadas, mas que são base para o seguimento de novos testes de caráter *in vivo*, sendo necessárias a fim de otimizar tempo, custos e garantir o bem estar animal.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão de bolsa, nível mestrado ao primeiro autor.

## Referências

- Abushelaibi, A., Al-Mahadin, S., El-Tarabil, K., Shah, N. P. & Ayuash, M. (2017). Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. *Food Science and Technology*, 79, p.316-325. doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.041
- Alwan A., Deignan T., O’Sullivan M., Kelly J. & O’Farrelly, C. (1998). Quantitative assay of *Salmonella* adherence to intestinal epithelia cells: A new method for assessing novel intervention products. *Journal of Microbiological Methods*, 33, p.163-170. doi.org/10.1016/s0167-7012(98)00052-9
- Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G. & Karatzas, K. A. G. (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. *Food Microbiology*, 33, p.282-289. doi: 10.1016/j.fm.2012.10.005
- Asha & Gayathri, D. (2012). Synergistic impact of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and vincristine on 1,2-dimethylhydrazine-induced colorectal carcinogenesis in mice. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 3, p.1049-1054. doi.org/10.3892/etm.2012.536
- Bratz, K., Gözl, G., Janczyk, P., Nökler, K. & Alter, T. (2015). Analysis of *in vitro* and *in vivo* effects of probiotics against *Campylobacter spp.*. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 12, p.155-162. doi.org/ 10.2376/0005-9366-128-155
- Bromberg, R., Moreno, I., Delboni, R. R. & Cintra, H. C. (2006). Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis ssp. hordniae* CTC484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26, p.135-144. dx.doi.org/10.1590/S0101-20612006000100023

Calazans, L. T. S., Andrade, M. A., Machado, B. A. S. & Minafra-Rezende, C. S. (2020). Estratégias para redução de *Campylobacter* termotolerantes em frangos. *Research, Society and Development*, 9(3), p.1-18. [dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i3.2440](http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i3.2440)

Carvalho, J. D. G. (2007). Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de Coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas. 154 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) *Departamento de Tecnologia de Alimentos*, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Chakchouk-mtibaa, A., Elleuch, S., Smaoui, S., Najah, I., Sellem, S. & Abdelkafi, L. (2014). An antilisterial bacteriocin BacFL31 produced by *Enterococcus faecium* FL31 with a novel structure containing hydroxyproline residues. *Anaerobe*, 27, p.1-6. [doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.02.002](http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.02.002)

Chaveerach, P., Keuzenkamp, D. A., Urlings, H. A., Lipman, L. J. & Knapen, F. (2002). *In vitro* study on the effect of organic acids on *Campylobacter jejuni/coli* populations in mixtures of water and feed. *Poultry Science*, 8, p.621-628. [doi.org/10.1093/ps/81.5.621](http://dx.doi.org/10.1093/ps/81.5.621)

Chen, P., Zhang, Q., Dang, H., Liu, X., Tian, F., Zhao, J., Chen, Y., Zhang, H. & Chen, W. (2014). Screening for potential new probiotic based on probiotic properties and glucosidase inhibitory activity. *Food Control*, 35, p.65-72. [doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.027](http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.027)

Christofoli, M., Souza, C. S., Costa, T. F., Alexandrino, S., Faria, P., Minhafra-Rezende, C., Santos, F., Minafra, C. & Pereira, P. S. (2020). Beneficial and harmful intestinal microbiota in poultry farming: Review. *Research, Society and Development*, 9(7), p.1-26. [dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i7.3667](http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i7.3667)

CLSI. Clinical a Laboratory Standards Institute. (2003). CLSI document M2-A8. Pennsylvania: West Valley Road.

Cocolin, L., Foschino, R., Comi, G. & Grazia Fortina, M. (2007). Description of the bacteriocins produced by two strains of *Enterococcus faecium* isolated from Italian goat milk. *Food Microbiol*, 24, 752- 758. [doi.org/10.1016/j.fm.2007.03.001](http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2007.03.001)

Coppola, R., Succi, M., Tremonte, P. & Reale, A. (2005). Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *Lait*, 85, p.193-204. doi.org/10.1051/lait:2005007

Das, P., Khowala, S. & Biswas, S. (2016). *In vitro* probiotic characterization of *Lactobacillus casei* isolated from marine samples. *Food Science and Technology*, 73, 383-390. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.029>

Favaro, L., Basaglia, M., Casella, S., Hue, I., Dousset, X., Gombossy, D. E., Melo Franco, B. D. & Todorov, S.D. (2014). Bacteriocinogenic potential and safety evaluation of non-starter *Enterococcus faecium* strains isolated from home made white brine cheese. *Food Microbiol*, 38, p.228-239. doi.org/ 10.1016/j.fm.2013.09.008

Food and Drug Administration – FDA (2015). Early Clinical Trials With Live Biotherapeutic Products: Chemistry, Manufacturing, and Control Information; *Guidance for Industry; Request for Comments Federal Register Notice*.

Franz, C. M., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W. & Gálvez, A. (2011). Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International Journal Food Microbiol*, 151, p.125. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.014

García, S. L., Melero, B., Diez, A. M., Jaime, I., Canepa, A. & Rovira, J. (2020). Genotyping, virulence genes and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. isolated during two seasonal periods in Spanish poultry farms. *Preventive Veterinary Medicine*, 176, 104935. doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.104935

Giraffa, G. (2002). *Enterococcus* from foods. *FEMS Microbiology Reviews*, 26, 163-171. doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00608.x

Goh, H. F. & Philip, K. (2014). Isolation and mode of action of bacteriocin BacC1 produced by nonpathogenic *Enterococcus faecium* C1. *Journal Dairy Science*, 98, 1-1.

Gudiña, E. J., Rocha, V., Teixeira, J. A. & Rodrigues, L. R. (2010). Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *Paracasei*

A20. *Letters in Applied Microbiology*, 50, p.419-424. doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02818.x

Guedes Neto, L. G., Souza, M. R., Nunes, A. C., Nicoli, J. R. & Santos, W. L. M. (2005). Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microorganismos indicadores. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. Supl*, 2, 245-250. dx.doi.org/10.1590/S0102-09352005000800017

International Organization for Standardization – (ISO). (2006). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Campylobacter* – Part 1: Detection Method, 1thed. *The International Organization for Standardization*, (ISO 10272-1:2006). 16 p.

Kos, B., Suskovic, J., Vukovic, S., Simpraga, M., Frece, J. & Matosic, S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, 94, p.981-987. doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01915.x

Krasowska, A. & Sigler, K. (2014). How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs?. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 4, 1-7. doi.org/10.3389/fcimb.2014.00112

Kumar, A., Kumar, D. (2015). Characterization of *Lactobacillus* isolated from dairy samples for probiotic properties. *Clinical Microbiology*, 33, 117-123. doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.03.004

Laheinen, T., Malinen, E., Koort, J. M. K., Mertaniemi-Hannus, U., Hankimo, T., Karikoski, N., Pakkanen, S., Laine, H., Sillanpaa, H., Soderholm, H. & Palva, A. (2010). Probiotic properties of *Lactobacillus* isolates originating from porcine intestine and feces. *Anaerobe*, 16, p.293-300. doi.org/10.1016/j.anaerobe.2009.08.002

Lima, F. L. O. & Oliveira, G. A. L. (2020). Fatores associados ao impacto de gastroenterites por *Campylobacter jejuni*. *Research, Society and Development*, 9(7), 1-18.

Ma, L., Wang, Y., Shen, J., Zhang, Q. & Wu, C. (2014). Tracking *Campylobacter* contamination along a broiler chicken production chain from the farm level to retail in China. *International Journal Food Microbiology*, 181, 77-84. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.023

Maragkoudakis, P. A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B. & Tsakalidou, E. (2006). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 6, 189-199. doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.02.009

Meunier, M., Guyard-nicodeme, M., Dory D. & Chemaly, M. (2015). Control strategies against *Campylobacter* at the poultry production level: biosecurity measures, feed additives and vaccination. *Journal Appl. Microbiol*, 120, 1139-1173. doi.org/10.1111/jam.12986

Monteagudo-Mera, A., Rodríguez-Aparicio, L., Rúa, J., Martínez-Blanco, H., Navasa, N., García-Armesto, M. R. & Ferrero, M. A. (2012). *In vitro* evaluation of physiological probiotic properties of diferente lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. *Journal of functional foods*, 4, 531-541. doi.org/10.1016/j.jff.2012.02.014

Morrow, L. E., Gogineni, V. & Malesker, M. A. (2012). Probiotics in the intensive care unit. *Nutrition Clinical Practice*, 27, p.233-241. doi.org/10.1097/MCC.0b013e3283252d2d

Naidu, A. S., Bidlack, W. R. & Clemens, R. A. (1999). Probiotic spectra of lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39, 13-126. doi.org/10.1080/10408699991279187

NCCLS (2013). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard (8th ed.), Wayne, PA: NCCLS document M2-A8.

Pajarillo, E. A. B., Chae, J., Balolong, M., Kim, H. B. & Kang, D. (2014). Assessment of fecal bacterial diversity among healthy piglets during the weaning transition. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 60, p.140-146. doi.org/10.2323/jgam.60.140

Palomino, J. C., Martin, A., Camacho, M., Guerra, H., Swings, J. & Portaels, F. (2002). Resazurin Microtiter Assay Plate: simple and inexpensive method for detection of drug

resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, p.2720-2722. doi.org/10.1128/AAC.46.8.2720-2722.2002

Patel, R. M. & Denning, P. W. (2015). Intestinal microbiota and its relationship with necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res*, 78, p.232-8. doi.org/10.1038/pr.2015.97

Peres, P. A. B. M. (2020). Perfil virulento, disseminação fenotípica e distribuição espacial e sazonal de *Campylobacter jejuni* isoladas de carcaças de frango no Brasil. (Dissertação de Mestrado) Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais. doi.org/10.14393/ufu.di.2020.532

Plessas, S., Nouska, C., Karapetsas, A., Kazakos, S., Alexopoulos, A., Mantzourani, I., Chondrou, P., Fournomiti, M., Galanis, A. & Bezirtzoglou, E. (2017). Isolation, characterization and evaluation of the probiotic potential of a novel *Lactobacillus* strain isolated from Feta-type cheese. *Food Chemistry*, 226, p.102-108. doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.052

Rehaim, A., Ben, B. Z., Edalatian, M. R., Martinez, B., Rodriguez, A. & Manai, M. (2014). Assessment of potential probiotic properties and multiple bacteriocin encoding-genes of the technological performing strain *Enterococcus faecium* MMRA. *Food Control*, 37, 343-350. doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.044

Reis, T. L. & Vieites, F. M. (2019). Antibiotic, prebiotic, probiotic and symbiotic in feeds of broiler chickens and laying hens. *Ciência Animal*, 9(3), 133-147.

Rosenberg, M., Gutnick, D. & Rosenberg, E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons, a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*, 9, 29-33. doi.org/10.1111/j.1574-6968.1980.tb05599.x

Rosenberg, M., Kjelleberg, S. (1986). Hydrophobic interactions in bacterial adhesion. *Advances in microbial ecology*, 9, 353-393.

Ross, J. J. (2008). Considerations in the development of live biotherapeutic products for clinical use. *Curr. Issues Mol. Biol*, 10, 13-16.

Santos, D. S., Calaça, P. R. A., Porto, A. L. F., Souza, P. R. E., Freitas, N. S. A. & Soares, M. T. C. V. (2020). What Differentiates Probiotic from Pathogenic Bacteria? The Genetic Mobility of *Enterococcus faecium* Offers New Molecular Insights. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*. doi:10.1089/omi.2020.0078

Santos, T. T., Ornellas, R. M., Arcucio, L. B., Oliveira, M. M., Nicoli, J. R., Dias, C. V., Uetanabaro, A. P. T. & Vinderola, G. (2016). Characterization of lactobacilli strains derived from cocoa fermentation in the south of Bahia for the development of probiotic cultures. *Food Science and Thecnology*, 73, 259-266. doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.003

Simmons, M. C., Rouanet, A. & Pot, B. (2020). Live biotherapeutic products: the importance of a defined regulatory framework. *Experimental & Molecular Medicine*, 1-10. doi.org/10.1038/s12276-020-0437-6

Sonsa-ard, N., Rodtong, S., Chikindas, M. L. & Yongsawatdigul J. (2015). Characterization of bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* CN-25 isolated from traditionally Thai fermented fish roe. *Food Control*, 54, 308-316. doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.010

Thirabunyanon, M. & Hongwittayakorn, P. (2013). Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria of Human Origin Induce Antiproliferation of Colon Cancer Cells via Synergic Actions in Adhesion to Cancer Cells and Short-Chain Fatty Acid Bioproduction. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 169, 511-525. doi.org/10.1007/s12010-012-9995-y

Thirabunyanon, M. & Thongwittaya, N. (2012). Protection activity of a novel probiotic strain of *Bacillus subtilis* against *Salmonella Enteritidis* infection. *Research in Veterinary Science*, 93, 74-81. doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.08.008.

Todorov, S. D. (2007). Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosuss* t712bz isolated from boza. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, p.166-172. dx.doi.org/10.1590/S1517-83822007000100034

Todorov, SD. (2010). Characterization of bacteriocins produced by two strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from Beloura and Chouriço, traditional pork products from Portugal. *Meat Science*. 84, 334-343. doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.08.053.

Todorov, S. D. & Dicks, L. M. T. (2005). *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 318-326. doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.09.009

Torres, A. C. D., Haas, D. J. & Siqueira, N. D. A. (2016). Principais zoonoses bacterianas de aves domésticas e silvestres. *Veterinária em foco*, 14(1), 47-59.

Vahjen, W. & Männer, K. (2003). The effect of a probiotic *Enterococcus faecium* product in diets of healthy dogs on bacteriological counts of *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.* and *Clostridium spp.* In faeces. *Arch. Anim. Nutr*, 57, 229-233. doi.org/10.1080/0003942031000136657

#### **Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito**

Priscilla Régia de Andrade Calaça – 30%

Elaine Cristina da Silva – 10%

Felipe Pereira de Melo – 10%

Dayane da Silva Santos – 10%

Ana Beatriz Lins Aragão – 5%

Pablo Eugênio da Costa e Silva – 5%

Mércia Rodrigues Barros – 5%

Ana Lúcia Figueiredo Porto – 10%

Maria Taciana Holanda Cavalcanti – 15%