Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

MARIA CECÍLIA DE LIMA E SILVA

ANÁLISE DE POTENCIAL PROBIÓTICO DE UMA CEPA DE *Enterococcus faecium* ISOLADO DO MEL

Recife
2025

MARIA CECÍLIA DE LIMA E SILVA

ANÁLISE DE POTENCIAL PROBIÓTICO DE UMA CEPA DE *Enterococcus faecium* ISOLADO DO MEL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.
Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio de Morais Junior
Coorientador: Dr. Allyson Andrade Mendonça

Recife
2025

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Silva, Maria Cecília de Lima e.
Análise de potencial probiótico de uma cepa de Enterococcus faecium isolado do mel / Maria Cecília de Lima e Silva. - Recife, 2025.
50 p. : il., tab.

Orientador(a): Marcos Antônio de Morais Junior
Cooorientador(a): Allyson Andrade Mendonça
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2025.
Inclui referências.

1. Probióticos. 2. Microbiologia. 3. Genética. 4. Resistência. 5. Antibióticos. I. Morais Junior, Marcos Antônio de. (Orientação). II. Mendonça, Allyson Andrade. (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

MARIA CECÍLIA DE LIMA E SILVA

ANÁLISE DE POTENCIAL PROBIÓTICO DE UMA CEPA DE *Enterococcus faecium* ISOLADO DO MEL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: ___/___/____

BANCA EXAMINADORA

_____

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio de Morais Junior
UFPE/ Departamento de Genética

_____

Drª. Carolina Elsztein
UFPE/ CETENE

_____

Me. Tiago Luiz Santana Calazans
UFPE/ Departamento de Genética

Dedico este trabalho aos meus pais, que mesmo com tanta dificuldade me apoiaram e me permitiram chegar até o final dessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao meu orientador Dr. Marcos Morais, e ao meu coorientador, Dr. Allyson Mendonça, por todo o apoio e orientação durante essa jornada acadêmica. Agradeço ao CNPq pelo suporte financeiro proporcionado através do PIBITI/UFPE/CNPq 2023-2024. A todos os pesquisadores do Laboratório de Genética de Microrganismos, do Laboratório de Metabolismo Microbiano e do Laboratório de Resistência Microbiana que puderam compartilhar seu conhecimento comigo, meu muito obrigada por cada pequena contribuição que enriqueceu este trabalho.

Agradeço também aos professores do curso de Biomedicina modalidade Bacharelado do Centro de Biociências (CB/UFPE), que foram fundamentais na minha formação acadêmica e profissional.

Agradeço profundamente aos meus pais, Sérgio e Josiane que em nenhum momento deixaram de me apoiar e sempre me incentivaram a seguir em frente, sendo a minha luz guia nos momentos mais difíceis em que estive perdida.

Agradeço a minha avó Ivanilda, in memorian, cuja presença foi essencial na minha vida e me ajudou a ser quem sou hoje. Obrigada por sempre cuidar de mim.

Aos amigos que me acompanharam desde o início dessa jornada, Marília, Radija e Alexander, e aos meus amigos que conheci durante ela, Débora, Gabrielly, Gabriel, Vivian, Bruna, José do Carmo e Yasmin, vocês foram essenciais nessa etapa da minha vida, muito obrigada por sempre estarem ao meu lado.

Gostaria de agradecer também aos meus demais familiares que mesmo de forma indireta contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado.

"*O homem não teria alcançado o possível se, repetidas vezes, não tivesse tentado o impossível*."

Max Weber

SILVA, Maria Cecília de Lima e. **Análise de potencial probiótico de uma cepa de *Enterococcus faecium* isolado do mel**. 2025. 50 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2025.

RESUMO

Enterococos são bactérias ubíquas que habitam o trato intestinal de humanos e animais, e também podem ser encontradas no solo e na água. Por serem microrganismos capazes de se desenvolver em condições extremas, podem habitar diversos ambientes, como hospitais, o que acaba destacando a sua importância clínica, apesar de serem também utilizados como probióticos em alimentos fermentados com o propósito de desenvolvimento de sabor e qualidade dos produtos. Em pesquisas recentes pelo Laboratório de Genética de Microrganismos, foi possível isolar a bactéria *Enterococcus faecium* a partir de amostras de mel. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo fazer o sequenciamento, a anotação e análise do genoma dessa bactéria, assim como também determinar a sua capacidade de resistência a antibióticos e também sua capacidade de sobreviver a condições semelhantes ao do trato gastrointestinal, para definir se a cepa isolada tem potencial biotecnológico como probiótica. Os experimentos incluíram realizar a extração de DNA do isolado pelo método disponível na literatura, sendo posteriormente esse DNA encaminhado para o sequenciamento. A partir do sequenciamento foi feita uma anotação e análise do genoma obtido onde foi possível observar que o genoma de *E. faecium* é composto por 2.409 genes que são distribuídos em diferentes categorias funcionais, estando presentes também genes importantes para a caracterização da cepa isolada como probiótica, como o gene entP. Ademais, os experimentos realizados para definir a sua susceptibilidade a antibióticos nos permitiu concluir que a bactéria não possui resistência a antibióticos clinicamente relevantes, assim como a simulação de passagem pelo trato gastrointestinal (TGI) nos permite observar que o microrganismo está apto a sobreviver em condições estressantes. Com os resultados obtidos é possível observar que o microrganismo isolado possui potencial como uma bactéria probiótica e não apresenta risco à saúde pública. Dessa forma, a pesquisa evidencia a importância de uma análise genômica na identificação de bactérias possivelmente probióticas.

Palavras-chave: Microbiologia. Genética. Probióticos. Resistência. Antibióticos.

SILVA, Maria Cecília de Lima e. **Analysis of probiotic potential of an *Enterococcus faecium* strain isolated from honey**. 2025. 50 pages. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2025.

ABSTRACT

Enterococci are ubiquitous bacteria that inhabit the intestinal tract of humans and animals, and can also be found in soil and water. Because they are microorganisms capable of developing in extreme conditions, they can inhabit various environments, such as hospitals, which highlights their clinical importance, although they are also used as probiotics in fermented foods for the purpose of developing flavor and quality of products. In recent research by the Microorganism Genetics Laboratory, it was possible to isolate the bacteria *Enterococcus faecium* from honey samples. Thus, the objective of this work was to sequence, annotate and analyze the genome of this bacteria, as well as determine its capacity for resistance to antibiotics and its ability to survive conditions similar to those of the gastrointestinal tract, to define whether the isolated strain has biotechnological potential as a probiotic. The experiments included extracting DNA from the isolate using the method available in the literature, and then sending this DNA for sequencing. From the sequencing, an annotation and analysis of the obtained genome were made, where it was possible to observe that the genome of *E. faecium* is composed of 2,409 genes that are distributed in different functional categories, and also important genes for the characterization of the isolated strain as probiotic, such as the entP gene. Furthermore, the experiments performed to define its susceptibility to antibiotics allowed us to conclude that the bacteria does not have resistance to clinically relevant antibiotics, just as the simulation of passage through the gastrointestinal tract (GIT) allows us to observe that the microorganism is able to survive under stressful conditions. With the results obtained, it is possible to observe that the isolated microorganism has potential as a probiotic bacterium and does not pose a risk to public health. Thus, the research highlights the importance of genomic analysis in the identification of potentially probiotic bacteria.

Key words: Microbiology. Genetics. Probiotics. Resistance. Antibiotics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Árvore Filogenética do gênero *Enterococcus* 17
Figura 2 – Modelo de parede enterocócica 19
Figura 3 – Linha do Tempo de eventos importantes na história dos enterococos 23
Figura 4 – Mapa da anotação do genoma completo de E. faecium isolado do mel 33
Figura 5 – Mapa da anotação funcional do genoma de E. faecium isolado do mel 34
Figura 6 – Ilhas de patogenicidade nos genomas de *E. faecium* isolado do mel e duas cepas de *E. faecium* patogênicas 35
Figura 7 – Elementos genéticos móveis presentes no genoma de *E. faecium* isolado do mel 37
Figura 8 – Alinhamento do genoma do fago encontrado no genoma de *E. faecium* isolado do mel com o genoma de fagos identificados no gênero *Enterococcus* 38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Genes de importância biotecnológica encontrados no genoma de *E. faecium* isolado do mel 34

Tabela 2 – Genes de resistência a antibióticos encontrados no genoma 36

Tabela 3 – Fatores de virulência encontrados nos genomas de *Enterococcus faecium* 36

Tabela 4 – Resultados de Concentração Mínima inibitória (CIM) dos antibióticos 38

LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1 – Viabilidade das células da bactéria *Enterococcus faecium* cultivadas em meio SYC, após exposição a fluidos gástricos e fluidos entéricos. 39

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	**14**
2	**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**	**16**
2.1	O Gênero Enterococcus	16
2.1.1	História do Gênero *Enterococcus*	16
2.1.2	Morfologia e Características Celulares	18
2.1.3	Características Fisiológicas	18
2.1.4	Nichos Ecológicos	19
2.2	Enterococcus faecium	20
2.2.1	Características Gerais	20
2.2.2	Descoberta e Classificação Inicial	21
2.2.3	Patogenicidade	22
2.3	Probióticos	24
2.3.1	Definição	24
2.3.2	Efeitos Probióticos	24
2.3.3	Fatores Probióticos	25
3	**OBJETIVOS**	**27**
3.1	Objetivo Geral	27
3.1	Objetivo Específico	27
4	**METODOLOGIA**	**28**
4.1	Microrganismos e Condições de Cultivo	28
4.2	Extração de DNA	28
4.3	Sequenciamento e Identificação do Isolado	29
4.4	Análise e Anotação do Genoma	30
4.4.1	Ilhas de Patogenicidade, Genes de Resistência a Antibióticos e genes de Virulência	31
4.4.2	Elementos Genéticos Móveis e Presença de Fagos	31
4.5	Teste de Susceptibilidade a Antibióticos	32
4.6	Teste de Sobrevivência em Condições Gastrointestinais Simuladas *in Vitro*	32
5	**RESULTADOS**	**33**
5.1	Anotação de Genoma e Análise Pan Genoma	33
5.2	Ilhas de Patogenicidade, Genes de Resistência a Antibióticos e Genes de Virulência	35

5.3 Elementos Genéticos Móveis e Presença de Fagos 37
5.4 Teste de Susceptibilidade a Antibióticos 38
5.5 Teste de Sobrevivência em Condições Gastrointestinais Simuladas *in Vitro* 39
6 DISCUSSÃO 40
7 CONCLUSÃO 44
8 REFERÊNCIAS 45

1 INTRODUÇÃO

Os *Enterococcus* são bactérias ácido lácticas (LAB) Gram-positivas que habitam o trato gastrointestinal de humanos e animais, além também de poderem ser encontradas no solo, na água e em diversos alimentos (Rocha *et al*., 2018). Atualmente, devido ao potencial de aplicação como probióticos para humanos ou animais, muitas bactérias lácticas benéficas foram isoladas de diferentes ambientes naturais, incluindo os membros do gênero *Enterococcus* (Dimov *et al*., 2020).

Entre as espécies desse gênero, *Enterococcus faecium* desempenha um papel importante no desenvolvimento de sabor e qualidade de alguns alimentos fermentados, assim como também estudos demonstraram que suas enterocinas podem ter uma influência benéfica na saúde de uma variedade de hospedeiros. Essas características, combinadas com sua resiliência, os torna excelentes candidatos probióticos. No entanto, apesar de suas propriedades benéficas *E. faecium* também se destaca por sua relevância clínica, especialmente devido à sua capacidade de desenvolver resistência a múltiplos antibióticos, como a vancomicina (Rocha *et al*., 2018; Lam *et al*., 2012; Lauková *et al*., 2024).

Atualmente, vários estudos verificaram a presença de genes de resistência em isolados de alimentos, assim como também a resistência intrínseca aos antimicrobianos comumente utilizados no tratamento de Gram-positivos e isso se deve pela capacidade desse isolado de adquirir esses genes por meio de certos fatores, sendo eles: transferência de plasmídeos, troca cromossômica ou mutações. Esses fatores aliados ao aumento da associação desse microrganismo com doenças em seres humanos tem despertado preocupações em relação ao uso de enterococos como probióticos (Rocha *et al*., 2018; Hammad *et al*., 2014).

Enterococos são bactérias que podem possuir propriedades benéficas, mas que também podem conter genes de fatores de virulência. Portanto, é necessário olhar para essa espécie bacteriana de dois pontos de vista, benéfico e não benéfico, para avaliar cada um desses potenciais para seu uso futuro (Lauková *et al*., 2024).

A análise genômica de isolados de *E. faecium* provenientes de alimentos permite uma compreensão aprofundada dos mecanismos de resistência antimicrobiana, fatores de virulência e potencial de adaptação a diferentes nichos ecológicos. Além disso, análises pangenômicas revelaram uma alta similaridade entre linhagens de *E. faecium*, indicando a presença de diversos genes em comum e

sugerindo uma plasticidade genômica que contribui para sua adaptabilidade (Mascarenhas *et al*., 2023).

Diante disso, este estudo tem como objetivo realizar uma análise genômica de uma linhagem de *Enterococcus faecium* isolada de uma amostra de mel, visando identificar genes de resistência a antimicrobianos, fatores de virulência e elementos genéticos móveis. A compreensão desses aspectos contribuirá para elucidar os riscos potenciais associados à presença de *E. faecium* em produtos apícolas, assim como fornecerá informações para uso biotecnológico da espécie como probiótica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Gênero Enterococcus

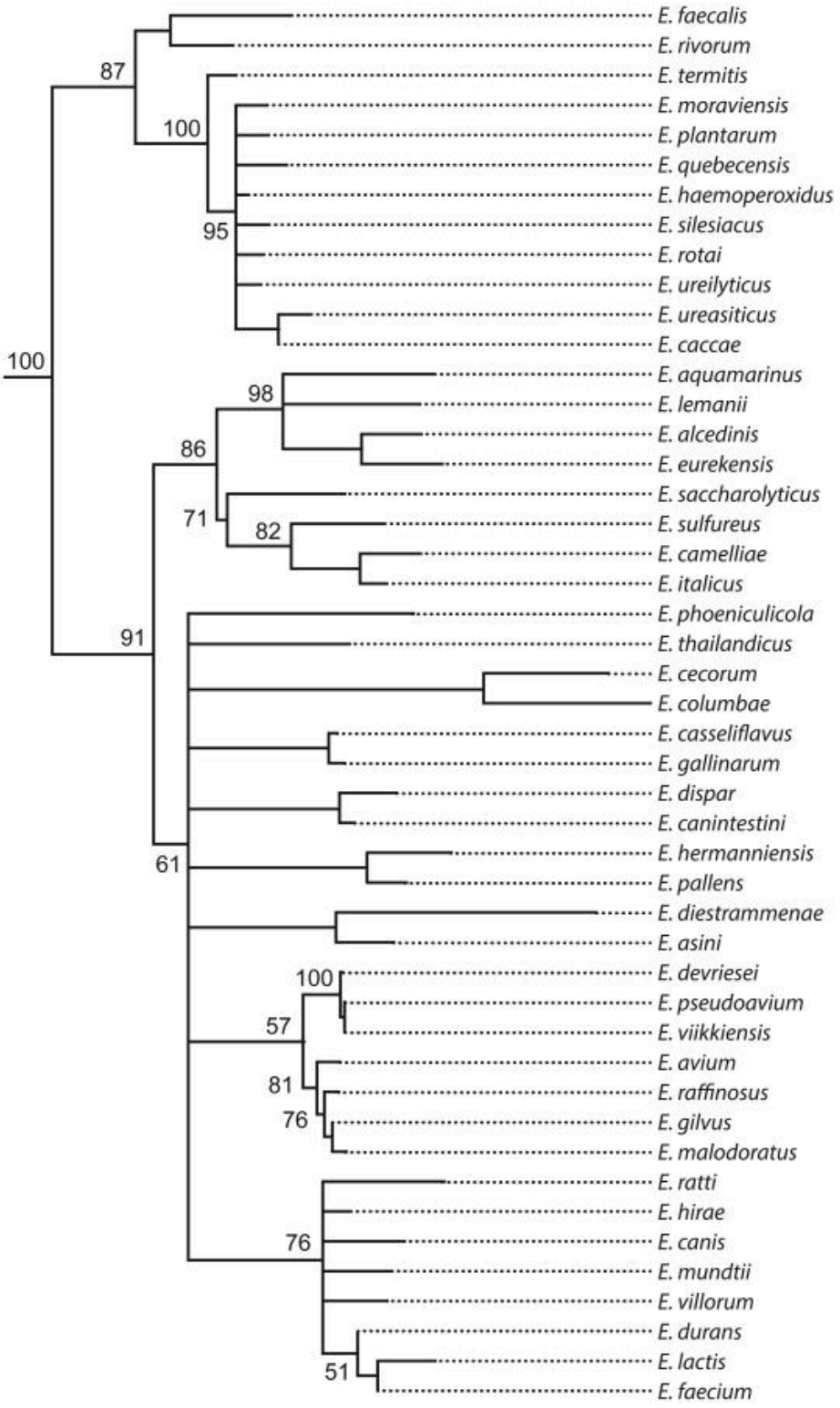
2.1.1 História do Gênero *Enterococcus*

O gênero *Enterococcus* representante da família Enterococcaceae e pertencente ao filo *Firmicutes* contém 61 espécies descritas de forma válida. O grupo é composto por bactérias ácido lácticas (LAB) que são cocos Gram-positivos amplamente distribuídos no ambiente, sendo comumente encontrados no trato gastrointestinal de humanos e animais, além de habitats como solo, água e alimentos (Rocha *et al*., 2018; Vinderola *et al*., 2024). A história do gênero remonta ao século 19, quando os *Enterococcus* foram inicialmente classificados dentro do grupo dos *Streptococcus* devido às suas características morfológicas semelhantes. Apenas após a introdução de métodos moleculares para caracterização desses microrganismos, eles passaram por mudanças consideráveis na taxonomia, e começaram a ser reconhecidos como um gênero separado (Teixeira *et al*., 2015).

A partir de estudos de hibridização de DNA-DNA e DNA-rRNA e estudos sorológicos usando antissoros de superóxido dismutase (SOD) e o sequenciamento de RNA ribossomal 16S, o gênero *Enterococcus* foi formalmente separado do gênero *Streptococcus* e estabelecido como uma nova classificação taxonômica em 1984 (Devriese *et al*., 1995).

Desde então, os enterococos passaram a ser reconhecidos não apenas como componentes naturais da microbiota intestinal, mas também como organismos com relevância clínica e ambiental. Algumas espécies, como *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*, ganharam destaque devido ao seu envolvimento em infecções nosocomiais e sua crescente resistência a antimicrobianos, tornando-se uma preocupação global de saúde pública (Van Tyne & Gilmore, 2014).

Figura 1: Árvore filogenética do gênero Enterococcus. As sequências de genes 16S rRNA disponíveis para cada espécie foram compiladas usando o software Geneious (Biomatters, Ltd., San Francisco, Califórnia) com um algoritmo neighbor-joining. A sequência 16S rRNA de Vagococcus lutrae foi usada como um outgroup. Os valores bootstrap são mostrados para nós com mais de dois ramos e foram gerados em mais de 1.000 iterações.



Fonte: Van Tyne & Gilmore, 2014

2.1.2 Morfologia e Características Celulares

Microscopicamente as bactérias do gênero se apresentam como cocos dispostos em pares ou cadeias curtas. A sua estrutura celular é composta por uma espessa parede de peptidoglicano, característica de Gram-positivas e que compreende quase 90% do peso total da parede celular, conferindo resistência a fatores ambientais adversos, como variações de temperatura, pH e salinidade. Ainda esses microrganismos não são formadoras de esporos e, na maioria das espécies, não apresentam motilidade (Foulquié Moreno *et al*., 2006; Hancock *et al*., 2014).

Uma característica distintiva dos *Enterococcus* é a presença de proteínas de superfície que desempenham funções essenciais na adesão ao tecido de hospedeiros e na formação de biofilmes, um exemplo dessas proteínas seria a substância de agregação (AS) que desempenha função adesiva durante o processo de conjugação bacteriana, o que contribui para a patogenicidade desses microrganismos em infecções humanas (Kayaoglu *et al*., 2004). Além disso, essas bactérias possuem ácido teicóico (WTA) e ácido lipoteicóico (LTA) em sua parede celular, estruturas que influenciam sua interação com o sistema imunológico do hospedeiro (Sava *et al*., 2010).

A identificação morfológica de *Enterococcus* spp. em laboratório é geralmente realizada por meio de coloração de Gram e cultivo em meios específicos, como o ágar bile-esculina, que permite a diferenciação baseada na capacidade de hidrolisar esculina na presença de sais biliares (Koneman *et al*., 2018).

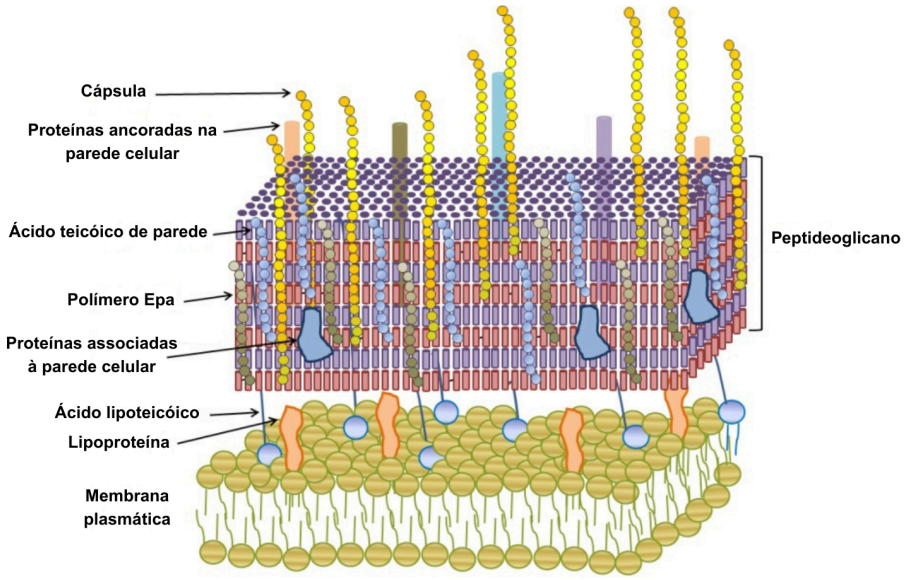
2.1.3 Características Fisiológicas

Os enterococos são microrganismos extremamente versáteis e adaptáveis, capazes de sobreviver em diferentes condições ambientais. Eles apresentam crescimento ótimo a 35°C, embora possam crescer em uma ampla faixa de temperaturas que variam entre 10°C a 45°C, conseguindo também resistir a um pH de 9,6, e suportarem concentrações de NaCl de até 6,5% (Foulquié Moreno *et al*., 2006). Essa resistência a condições adversas permite que os enterococos persistam em ambientes extremos por longos períodos, tornando-se um grupo bacteriano relevante para estudos ecológicos e microbiológicos. Além disso, muitas espécies de

Enterococcus se apresentam como anaeróbios facultativos, sendo homofermentativos e produzindo ácido láctico como o produto final da fermentação da glicose, sem produção de gás (Lebreton *et al*., 2014).

No contexto clínico, os enterococos são notáveis por sua capacidade de resistir a múltiplos antibióticos. Muitas cepas apresentam resistência intrínseca a β-lactâmicos de espectro reduzido e aminoglicosídeos de baixa potência, além de possuírem grande plasticidade genética, o que favorece a aquisição de genes de resistência por meio de elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons (Miller *et al*., 2014; García-Solache & Rice, 2019).

Figura 2: Modelo da parede celular enterocócica



Fonte: Hancock *et al*., 2014 (Adaptado)

2.1.4 Nichos Ecológicos

Os enterococos são microrganismos ubíquos que podem ser encontrados em diversos nichos ecológicos. No ambiente natural, estão presentes no solo, nas águas, além também de integrarem a microbiota intestinal de humanos e animais (Lauková, 2024). Também podem estar presentes em produtos alimentícios, sendo frequentemente isolados de queijos e outros alimentos fermentados, onde podem

atuar como bactérias láticas benéficas ou indicar contaminação (Rocha *et al*., 2018).

Entretanto, a adaptação dos enterococos a diferentes ambientes levou à emergência de linhagens distintas, com implicações clínicas e ambientais. As cepas ambientais geralmente apresentam menor resistência antimicrobiana e são mais associadas a processos fermentativos e à degradação de matéria orgânica. Em contrapartida, as cepas clínicas são frequentemente isoladas em ambientes hospitalares e caracterizam-se por sua alta resistência a antibióticos, incluindo a vancomicina, tornando-se agentes de infecções oportunistas, como endocardites e infecções urinárias (Lauková, 2024; García-Solache & Rice, 2019).

A origem da resistência antimicrobiana em enterococos clínicos tem sido amplamente discutida, e evidências sugerem que o uso indiscriminado de antibióticos na pecuária e na medicina humana contribui para a seleção de linhagens resistentes (Kristich *et al*., 2014; Miller *et al*., 2014). Além disso, estudos demonstram que a transferência horizontal de genes de resistência entre enterococos e outras bactérias patogênicas, como *Staphylococcus aureus*, pode ocorrer em ambientes hospitalares, agravando o problema da disseminação da resistência (Palmer *et al*., 2010).

Dessa forma, compreender as diferenças entre enterococos ambientais e clínicos é essencial para o desenvolvimento de estratégias eficazes de controle microbiológico, especialmente no contexto hospitalar e na cadeia de produção de alimentos. A vigilância genômica dessas bactérias tem se mostrado uma ferramenta crucial para monitorar a disseminação de genes de resistência e avaliar o impacto ecológico de sua presença em diferentes nichos (Amuasi *et al*., 2023).

2.2 Enterococcus faecium

2.2.1 Características Gerais

Enterococcus faecium é uma bactéria ácido-lática (BAL) Gram-positiva que está amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas no trato gastrointestinal de humanos e animais, bem como no ambiente, incluindo solo, água e alimentos. Entre as espécies de seu gênero, *E. faecium* se destaca devido à sua relevância tanto como potencialmente benéfica/probiótica quanto como patógeno oportunista (Rocha *et al*., 2018; Lauková, 2024).

No Brasil, *E. faecium* possui uma alta taxa de prevalência em queijos, e isso se deve pelo seu importante papel na melhoria da qualidade e sabor do queijo, assim como também de outros alimentos fermentados. No entanto, a sua presença em alimentos nem sempre se deve às suas propriedades benéficas, podendo ser um indício de contaminação, seja ela fecal ou por água e solo contaminado (Rocha *et al*., 2018).

De um ponto de vista geral, assim como as outras integrantes do gênero, *E. faecium* é uma bactéria cocoide, disposta em pares ou em cadeias curtas, e apresenta metabolismo anaeróbio facultativo, sendo capaz de crescer em condições aeróbicas e anaeróbicas. Sua estrutura celular inclui uma espessa parede de peptidoglicano, característica de bactérias Gram-positivas, o que lhe fornece uma grande capacidade de adaptação possibilitando-a crescer em uma amplitude de temperaturas assim como também em meios que contêm a presença de sais biliares (Lebreton *et al*., 2014; Foulquié Moreno *et al*., 2006). Além disso, essa espécie possui mecanismos que lhe conferem resistência intrínseca a diversos antimicrobianos, incluindo cefalosporinas e aminoglicosídeos, dificultando o tratamento de infecções associadas a ela (Arias & Murray, 2012).

A resistência antimicrobiana e a plasticidade genética de *E. faecium* são fatores que contribuem para sua sobrevivência em diferentes ambientes, tornando essa bactéria um dos principais patógenos nosocomiais da atualidade. Além disso, a aquisição de elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons, favorece a disseminação de genes de resistência, como os que conferem resistência à vancomicina (VRE – *vancomycin-resistant enterococci*), um dos principais desafios da saúde pública mundial (Kristich *et al*., 2014).

2.2.2 Descoberta e Classificação Inicial

A classificação de *Enterococcus faecium* tem uma história que reflete os avanços na microbiologia e na taxonomia bacteriana. Inicialmente, as bactérias desse gênero eram classificadas dentro do grupo dos *Streptococcus*, especificamente no grupo sorológico D. No entanto, com o desenvolvimento de métodos fenotípicos e genotípicos mais precisos, essas bactérias foram reclassificadas em um novo gênero, *Enterococcus*, em 1984, separando-se do gênero *Streptococcus* (Teixeira *et al.*, 2015).

Técnicas como o sequenciamento do gene 16S rRNA são ferramentas poderosas para a identificação e caracterização de *E. faecium*, no entanto pelas suas limitações o sequenciamento de outros determinantes genéticos, como por exemplo genes de manutenção que codificam proteínas envolvidas em funções celulares básicas, têm sido cada vez mais usados como ferramentas adicionais para avaliar as relações filogenéticas entre as espécies do gênero e também para descrever novas espécies (Devriese *et al.*,1995; Teixeira *et al.*, 2015).

Atualmente, o reconhecimento da diversidade genética dentro da espécie *E. faecium* tem levado à distinção entre linhagens comensais e patogênicas, sendo estas últimas associadas principalmente a infecções hospitalares e resistência antimicrobiana (Willems et al., 2012).

2.2.3 Patogenicidade

Embora *E. faecium* seja frequentemente encontrado como parte da microbiota normal do trato gastrointestinal de humanos e animais, algumas linhagens adquiriram fatores de virulência e resistência a antibióticos, tornando-se patógenos oportunistas relevantes, especialmente em ambientes hospitalares.

As cepas patogênicas de *E. faecium* são caracterizadas por sua associação com infecções nosocomiais, incluindo infecções do trato urinário, endocardites, bacteremias e infecções em feridas cirúrgicas. Um dos principais fatores de preocupação em relação a essas cepas é sua resistência a múltiplos antibióticos, incluindo β-lactâmicos, aminoglicosídeos e glicopeptídeos, como a vancomicina (Arias & Murray, 2012; García-Solache & Rice, 2019).

A resistência à vancomicina (*vanA* e *vanB*) tem sido amplamente estudada devido ao impacto clínico significativo que representa. Essas cepas resistentes, conhecidas como VRE , são responsáveis por surtos hospitalares e apresentam uma alta capacidade de disseminação, dificultando o controle das infecções associadas (Miller *et al*., 2014).

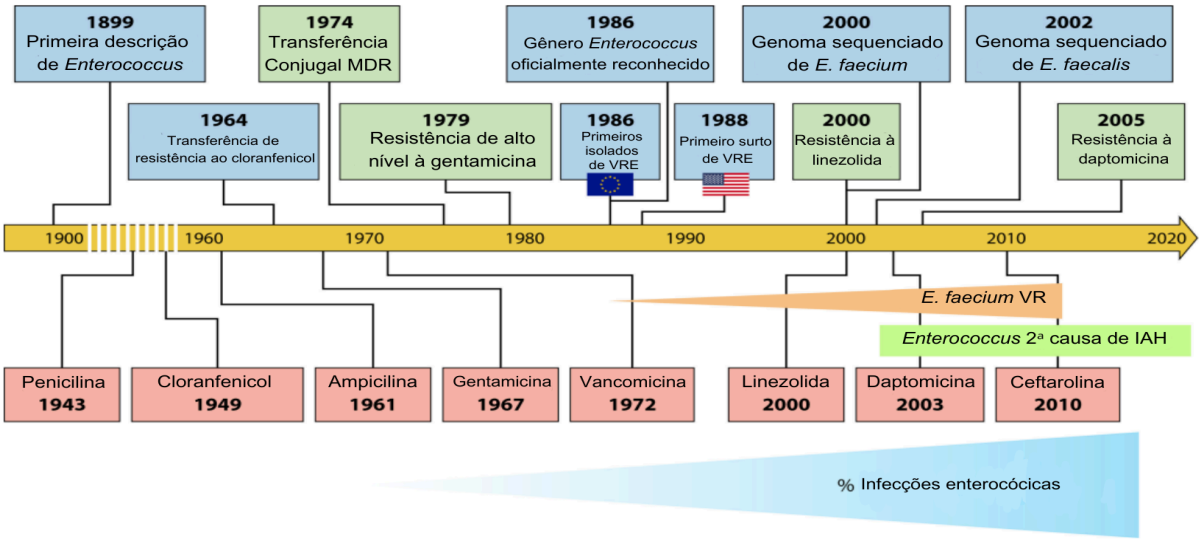
Além da resistência antimicrobiana, as cepas patogênicas possuem fatores de virulência, como a proteína de superfície Esp, associada à formação de biofilmes, e a proteína de agregação Asa1, que facilita a adesão às células hospedeiras e ao

epitélio intestinal. Esses fatores aumentam a persistência dessas cepas no ambiente hospitalar e contribuem para a sua patogenicidade (Sava *et al*., 2010).

Em contraste com as linhagens patogênicas, algumas cepas de *E. faecium* não apresentam os fatores de virulência associados à infecção e são utilizadas, inclusive, como probióticos em medicina veterinária e na indústria de alimentos. Essas cepas são empregadas como preparações farmacêuticas na forma de suplementos alimentares para promover a saúde intestinal de animais e humanos, prevenindo a colonização por patógenos, melhorando a digestibilidade dos nutrientes e prevenindo doenças por estímulo do sistema imune. Além disso, essas cepas apresentam um potencial biotecnológico na indústria de laticínios, sendo utilizadas na produção de queijos e outros derivados fermentados, onde contribuem para o desenvolvimento de sabor e textura (Franz *et al*., 1999).

A distinção entre cepas patogênicas e não patogênicas é fundamental para a compreensão do impacto dessa espécie bacteriana na saúde humana e animal, assim como também entender suas aplicações na engenharia de alimentos e nutrigenômica. O monitoramento genético e a caracterização molecular dessas cepas são estratégias essenciais para a identificação e diferenciação entre as linhagens, já que a plasticidade genética desses microrganismos os tornam como geralmente não reconhecidos como seguros, apesar das cepas patogênicas e probióticas seguirem caminhos de evolução distintos (Santos *et al*., 2020).

Figura 3: Linha do tempo de eventos relevantes na história dos enterococos.



Fonte: García-Solache & Rice, 2019 (Adaptado)

2.3 Probióticos

2.3.1 Definição

O termo "probiótico" foi inicialmente utilizado para descrever substâncias produzidas por bactérias ou leveduras que promoviam o crescimento de outros microrganismos (Lilly *et al*., 1965). Com a evolução do conceito ao longo dos anos, a definição mais aceita atualmente é que os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, oferecem benefícios à saúde do hospedeiro, conforme proposto pela Organização Mundial da Saúde juntamente com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO & WHO, 2002).

Esses organismos enfrentam diversos desafios ao longo de sua vida útil, que vão desde o seu cultivo, que pode ser aeróbio e induzir a formação de espécies reativas de oxigênio, as quais prejudicam os componentes celulares (Imlay *et al.,* 2019), até o seu contato com o hospedeiro. Durante esse processo, eles enfrentam proteínas antibacterianas presentes na saliva e também o baixo pH do estômago humano, que pode ser considerado um ambiente inóspito para a sua sobrevivência e assim afetando sua eficácia (Sun *et al.,* 2016; Freeman *et al*., 1978).

Os microrganismos mais comumente utilizados como probióticos pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, sendo amplamente estudados devido à sua capacidade de modular a microbiota intestinal, melhorar a digestão e reforçar a barreira intestinal contra patógenos (Hill *et al.,* 2014). No entanto, outros microrganismos, como *Saccharomyces* e algumas cepas dos gêneros bacterianos *Bacillus, Escherichia e Propionibacterium*, também apresentam efeitos probióticos promissores (Ouwehand *et al.,* 2002; Azad *et al*., 2018).

2.3.2 Efeitos Probióticos

Os probióticos exercem uma série de efeitos benéficos sobre a saúde do hospedeiro, sendo amplamente estudados por sua capacidade de regular a microbiota intestinal, melhorar a função imunológica, auxiliar na produção de metabólitos essenciais e prevenir doenças gastrointestinais (Hill *et al.,* 2014). Um

dos principais benefícios dos probióticos é a regulação da microbiota intestinal, uma vez que esses micro-organismos competem com bactérias patogênicas pela adesão à mucosa intestinal e produzem substâncias antimicrobianas, como bacteriocinas e ácidos orgânicos, que inibem o crescimento de microrganismos prejudiciais. Essa ação contribui para o equilíbrio do ambiente intestinal, melhorando a digestão e reduzindo distúrbios gastrointestinais (Ouwehand *et al.,* 2002; Lauková, 2024).

Além disso, os probióticos exercem um papel fundamental na modulação do sistema imunológico. Segundo estudos, algumas espécies comensais de *Lactobacillus* podem desempenhar um papel protetor contra doenças inflamatórias a partir da restauração do equilíbrio de citocinas pró-inflamatórias e células Treg (células T regulatórias) que acabam desempenham um papel crucial na manutenção da homeostase imunológica em muitas doenças. (Azad *et al*., 2018). Estudos demonstram que a ingestão de probióticos, como *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium lactis*, pode reduzir a incidência de infecções respiratórias e gastrointestinais, especialmente em populações mais vulneráveis, como crianças e idosos (Araujo *et al.,* 2015).

Outro aspecto importante dos probióticos é sua capacidade de produzir metabólitos benéficos. Algumas cepas são capazes de sintetizar vitaminas do complexo B e vitamina K, além de promover a produção de ácidos graxos de cadeia curta, como butirato, propionato e acetato (Cummings *et al*., 1997; Burkholder & McVeigh, 1942). Isto é importante porque os seres humanos não têm capacidade de biossintetizar a maioria das vitaminas e estas devem, portanto, ser fornecidas exogenamente (Leblanc *et al*., 2013).

Os probióticos também são amplamente utilizados na prevenção e tratamento de doenças gastrointestinais. Eles demonstram eficácia na redução da duração e gravidade da diarreia infecciosa, incluindo a diarreia associada ao uso de antibióticos. O *Saccharomyces boulardii*, por exemplo, tem sido amplamente estudado por sua ação na redução dos sintomas da diarreia causada por infecções bacterianas e virais (Kurugöl & Koturoğlu, 2007). Além disso, há evidências de que probióticos podem contribuir para a melhora dos sintomas da síndrome do intestino irritável e da doença inflamatória intestinal, ajudando a modular a resposta inflamatória do trato digestivo.

2.3.3 Fatores Probióticos

A eficácia dos probióticos depende de diversos fatores, como a escolha da cepa bacteriana, a dose administrada, a forma de consumo e a capacidade do microrganismo de sobreviver às condições do trato gastrointestinal. Cada cepa probiótica possui características específicas e desempenha funções distintas no organismo. Por exemplo, *Lactobacillus acidophilus* tem sido associado à melhora da digestão da lactose e ao fortalecimento da resposta imunológica, enquanto *Bifidobacterium breve* apresenta efeitos benéficos na redução da inflamação intestinal (Azad *et al*., 2018; Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001). Assim, a seleção da cepa correta é essencial para atingir os benefícios desejados.

A dose administrada também desempenha um papel fundamental na eficácia dos probióticos. Para que os efeitos benéficos sejam observados, é recomendada a ingestão de uma quantidade mínima de 10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) por porções diárias do produto (Brasil*,* 2024). Doses insuficientes podem não ser capazes de colonizar o intestino de forma adequada e proporcionar os efeitos esperados.

Outro fator relevante é a forma de consumo dos probióticos. Eles podem ser ingeridos por meio de alimentos fermentados, como iogurtes, kefir, chucrute e kombucha, ou na forma de suplementos em cápsulas e sachês. A escolha da matriz alimentar pode influenciar a viabilidade e a eficácia dos probióticos, pois alguns alimentos fornecem um ambiente mais favorável para a sobrevivência das bactérias até chegarem ao intestino (Padilha, 2015).

Por fim, a estabilidade e viabilidade dos probióticos são fatores críticos para sua funcionalidade. Para que esses microrganismos exerçam seus efeitos benéficos, eles devem permanecer viáveis até o momento do consumo e ser capazes de resistir ao ambiente hostil do trato gastrointestinal, incluindo o pH ácido do estômago e a presença de bile no intestino delgado. Estratégias como a microencapsulação de probióticos e a utilização de matrizes alimentares protetoras têm sido desenvolvidas para aumentar a taxa de sobrevivência dessas bactérias e garantir seus benefícios ao organismo (Rita, 2014).

Dessa forma, a escolha criteriosa da cepa, a dose adequada, a forma de consumo e a estabilidade dos probióticos são aspectos essenciais para garantir sua eficácia na promoção da saúde e na prevenção de diversas doenças.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estimar o potencial biotecnológico de aplicação do isolado bacteriano da espécie *Enterococcus faecium* como probiótico.

3.2 Objetivos Específicos

1. Determinar em nível genômico as propriedades probióticas do isolado analisado.
2. Determinar em nível genômico os potenciais riscos à saúde humana do isolado analisado.
3. Determinar o perfil de tolerância a antimicrobianos de relevância clínica do isolado analisado.
4. Determinar a viabilidade do isolado em condições gastrointestinais *in vitro*.

4 METODOLOGIA

4.1 Microrganismos e Condições de Cultivo

O isolado de *Enterococcus faecium* 58, foi obtido no curso do projeto APQ-0434-2.12/20 a partir de amostras de mel de abelha sem ferrão *Scaptotrigona tubiba*. A amostra de mel foi coletada de favos operculados, com seringas estéreis e depositada em microtubos de 2 mL também estéreis. O isolamento foi realizado em meio GYC-modificado [Glicose (10g/L), Extrato de Levedura (2g/L), Tween 80 (1g/L), Citrato de Amônio (2g/L), Peptona Bacteriológica (10g/L), Carbonato de Cálcio (6g/L)] acrescido de ágar a 2% (M/V). Após o isolamento, o isolado 58 foi preservado em meio GYC-modificado acrescido de glicerol a 15% e estocado a -80°C no Laboratório Central do Centro de Biociências da UFPE. Quando necessário, a cepa foi reativada em mesmo meio, cultivada por 24h. Tanto o isolamento com os cultivos deste isolado foram realizados a 37°C e estáticos.

4.2 Extração de DNA

O DNA total foi obtido a partir de culturas recentes, de até 24h. Após a obtenção das células bacterianas foi utilizado o protocolo de extração de DNA disponível na literatura (Lucena *et al*., 2010). As células foram coletadas por centrifugação a velocidade máxima por 5 minutos, suspendidas em um tampão de lise [50mM de Tris HCl e 10mM de EDTA HCl pH 8, e sacarose 1% (M/V)] e incubado por 37°C por 45 minutos em Thermo-shaker para microtubos. Foi adicionado SDS a uma concentração final de 1.25% (p/v), homogeneizado por inversão por 2 minutos. A seguir, foi adicionado uma solução de fenol clorofórmio [fenol saturado pH 8.0 25% (v/v), clorofórmio 24% (v/v) e álcool isoamílico 1% (v/v), volume final ajustado com água deionizada] na amostra de extração, proporção 1:1, homogeneizado por inversão por 2 minutos e centrifugado na velocidade máxima a 4°C por 15 minutos. Com a separação da fase orgânica inferior, a fase superior aquosa foi coletada para um novo microtubo e foi reiniciada a etapa de adição da solução de fenol clorofórmio. Após a coleta da fase aquosa para um novo tubo, pela segunda vez, foi realizada a precipitação do DNA com o isopropanol. Foi adicionado o isopropanol puro a -20°C, numa proporção de 1:1, homogeneizado por inversão

por 2 minutos e incubado em gelo por 30 minutos. Ao fim da incubação, as amostras foram centrifugadas, a velocidade máxima e a 4°C. O pellet obtido foi lavado com uma solução de etanol 70% (v/v) a -20°C. Após a lavagem, a amostra foi novamente centrifugada a velocidade máxima, por 15 minutos a 4°C. Em seguida, o pellet de DNA foi incubado a temperatura ambiente por 1h para secar, e, posteriormente, foi diluído em 50 µL de água estéril deionizada.

A pureza do DNA extraído foi aferida por espectrometria utilizando equipamento Nanodrop. O DNA puro foi definido como tendo uma razão de 260nm/230nm e 260nm/280nm acima de 2.0 (mensurando a contaminação com reagentes químicos) e 1.8 (mensurando interferência por proteínas), respectivamente, indicando assim pouca contaminação no material. A integridade do material foi avaliada através da separação por eletroforese em gel de agarose a 0.8% (p/v) preparado com tampão TAE 1.0 X (40mM de Tris HCl, 1mM de EDTA NaOH, 40 mM de ácido acético, pH final 8) com as configurações de 75 V e 35 mA por 1 hora. O DNA foi corado com 0.5 µg/ml de brometo de etídio adicionados no gel e visualizado em transluminador. O DNA foi considerado íntegro quando foi observado apenas uma banda de material fluorescente e ausências de zonas difusas de fluorescência a partir ou próxima desta banda. O material puro e íntegro foram mantidos a -20°C até o dia de uso.

4.3 Sequenciamento e identificação do isolado

A identificação molecular do isolado 58 foi realizada através da amplificação parcial do gene do rRNA 16S, padrão ouro na taxonomia molecular bacteriana. O fragmento do gene foi amplificado através da utilização dos primers 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Guyot *et al*., 1998; Lucena *et al*., 2010). Para a PCR foram utilizadas as condições descritas na literatura, o volume final foi ajustado para 25 µl contendo 0,5 µM de cada primer, 0.2 mM de cada dNTP, tampão de reação (1X) com 1,5 mM MgCl2 e 1 U de Taq DNA polimerase. A ciclagem utilizada foi um 1 ciclo de desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, a fase de hibridização dos primers foi composta de uma incubação a 55°C por 30 segundos, a etapa de alongamento ou polimerização com duração de 2 minutos à 72°C, finalizando com uma etapa de extensão final à 72°C por 7 minutos. Após a

conclusão da PCR, as amostras foram submetidas a separação eletroforética, como descrito no item 4.2. As amostras positivas foram purificadas com o kit wizard® sv gel and pcr clean-up system (Promega), seguindo as orientações do fabricante. Após a purificação, as amostras foram diluídas e enviadas para o sequenciamento na plataforma de sequenciamento do CB-UFPE, seguindo as orientações da unidade de serviço. Os eletroferogramas foram analisados com o software BioEdit versão 7.0 para comparação entre a sequência amplificada e a sequência alvo. Por fim, foram criadas sequências consenso que foram submetidas ao banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando a ferramenta BLASTn. Para a identificação foi adotado o depósito com maior score e menor e-value.

4.4 Análise e Anotação do Genoma

O DNA obtido, de acordo com item 4.2, foi utilizado para o sequenciamento do genoma do isolado 58. O sequenciamento foi realizado por NGS em equipamento Illumina no Grupo de Estudo e Vigilância da Resistência Antimicrobiana (GRAM) - Departamento de Microbiologia/IAM Fiocruz. As bibliotecas genômicas pair-end foram preparadas com a utilização do Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina) a partir do DNA genômico; purificadas pelo Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) e quantificadas em Qubit dsDNA High Sensitivity Assay Kit (Invitrogen). A biblioteca genômica de cada isolado foi então sequenciada na plataforma MiSeq (Illumina) em ciclos de 2 × 300 bp em MiSeq Reagent Kit v2 (Illumina). As reads foram analisadas e montadas em contigs na plataforma online Galaxy 0.5.1 (https://usegalaxy.org/) com a ferramenta Unicycler. A investigação pela presença de plasmídeo foi realizada com a ferramenta online PlasmidFinder 2.1 (https://cge.food.dtu.dk/services/PlasmidFinder/).

A anotação do genoma foi realizada no software Prokka 1.14.6 (Seemann, 2014), disponível online em (https://proksee.ca/tools/prokka) utilizando as configurações padrão. A análise do pan genoma da cepa de *E. faecium* isolada do mel foi realizada na ferramenta KEGG Sunburst Plot, uma dos programas disponíveis na plataforma online Edgar 3.0 (Dieckmann *et al*., 2021), disponível em: (https://edgar3.computational.bio.uni-giessen.de/cgi-bin/ed_gar. Cgi). A partir da

anotação do genoma, foi verificada a presença de genes de interesse biotecnológico no genoma de *E. faecium* isolado do mel.

4.4.1 Ilhas de Patogenicidade, Genes de Resistência a Antibióticos e genes de Virulência

Os genes de resistência a antibióticos foram identificados a partir do Comprehensive Antibiotic Resistance Database (https://card.mcmaster.ca/) usando o identificador de gene de resistência (RGI) em parâmetros padrão (McArthur *et al*., 2013). A presença de ilhas patogênicas foi testada com o auxílio do software IslandViewer 4 (Bertelli *et al*., 2017) em parâmetros padrão, para a cepa isolada do mel e duas cepas de *E. faecium* patogênicas: AuS0085 e 2014-VREF-63. O IslandViewer integra dois métodos de predição de GI de composição de sequência, SIGI-HMM e IslandPath-DIMOB, e um único método de predição de GI comparativo, IslandPick(https://www.pathogenomics.sfu.ca/islandviewer/). Os genes de virulência foram analisados na anotação no genoma de *E. faecium* isolado do mel e nas cepas *E. faecium* T110 e 170M39 probióticas, e Aus004 e DO patogênicas. Os genes de virulência analisados foram baseados no trabalho de Ghattargi *et al*., (2018).

4.4.2 Elementos genéticos móveis e presença de fagos

O estudo dos elementos transponíveis foi realizado na ferramenta mobileOG-db1.6 (Brown *et al*., 2022), servidor de busca de elementos genéticos móveis, utilizando o genoma completo como entrada. A presença de fagos foi detectada e anotada pelo PHIGARO 2.3.0 (Starikova *et al*., 2020) no Proksee (https://proksee.ca/) usando o genoma completo como entrada. Os quadros de leitura aberta foram previstos a partir do arquivo FASTA de entrada usando o Prodigal. A presença de fagos foi detectada no genoma de *E. faecium* isolada do mel, e o arquivo FASTA gerado pelo programa PHIGARO 2.3.0 serviu como entrada para a sintenia e foi desenhado pelo Viptree 4.0: o servidor de árvore proteômica viral (https://www.genome.jp/viptree/). A similaridade genômica viral foi calculada a partir de pontuações de similaridade genômica all-versus-all (SG) dos resultados do tBLASTx (Bhunchoth *et al*., 2016).

4.5 Teste de Susceptibilidade a Antibióticos

Foi realizado o teste de sensibilidade a antimicrobianos em colaboração com o Laboratório de Resistência Microbiana (LRM – ICB/UPE) em sistema automatizado VITEK, seguindo as orientações do fabricante com o protocolo ajustado para *Enterococcus sp*.

4.6 Teste de Sobrevivência em Condições Gastrointestinais Simuladas *in Vitro*

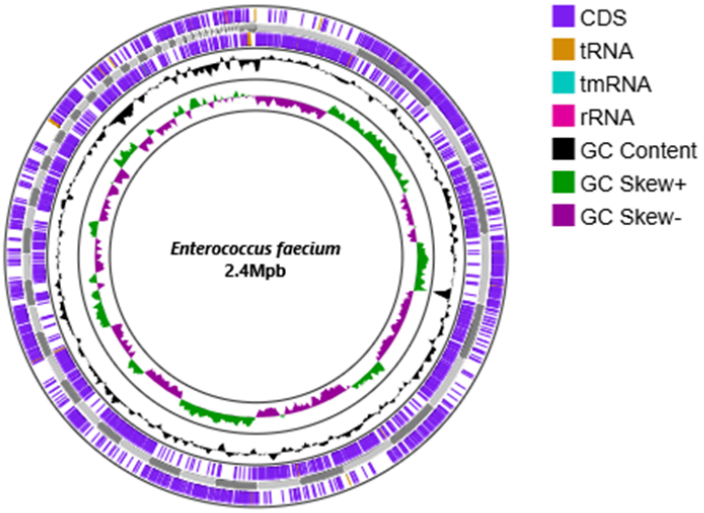
Foi analisada a sobrevivência do isolado estudado em simulações do trato gastrintestinal em colaboração com o Laboratório de Metabolismo Microbiano (LMM – ICB/UPE). Em simulação da fase gástrica, as bactérias livres foram inseridas em uma solução gástrica simulada contendo 3 g/L de pepsina (Neon, São Paulo, Brasil) em solução salina (0,9 %) com o pH ajustado para 2 com HCl 1M. Em seguida, as suspensões foram incubadas em um agitador orbital a 37 °C e 150 rpm (Tecnal, modelo TE-424) por 2 h. Na fase entérica I, o pH das suspensões foi reajustado para 5 com uma solução alcalina (150 mL NaOH 1 M em 14 g/L de NaH2PO4 para 1000 mL) e, posteriormente, 3 g/L de sais biliares (Difco Laboratories, Detroit, Estados Unidos) e 1 g/L de pancreatina (Sigma, Estados Unidos) foram adicionados ao sistema, que seguiu para a reincubação a 37 °C e 150 rpm por 2 h. Na fase entérica II, o pH das suspensões foi elevado para 7 com a solução alcalina, e os sais biliares e a pancreatina foram adicionados nas mesmas concentrações descritas anteriormente. O sistema foi incubado novamente a 37 °C e 150 rpm por 2 h. Durante o teste a avaliação da viabilidade celular foi feita nos tempos 0h, 2h e ao final do teste, a partir do método de contagem das unidades formadoras de colônia. Para isso 0,1 mL das amostras seguiram para as diluições seriadas e as células foram semeadas em placas de petri contendo meio SYC sólido, sendo mantidas a 30°C e contadas após 48h.

5 RESULTADOS

5.1 Anotação de genoma e análise de pan genoma

O genoma de *E. faecium* isolado do mel é composto por 2.409 genes (Figura 4), distribuídos em diferentes categorias funcionais caracterizadas pelo KEGG (Figura 5).

Figura 4. Mapa da anotação do genoma completo de *E. faecium* isolado do mel.



Fonte: Autor, 2025

Dos 2.409 genes presentes no genoma de *E. faecium* isolado do mel, 235 (9.75% do genoma total) são compostos de genes do metabolismo de carboidratos, que são fundamentais para a assimilação de açúcares como glicose, frutose, sacarose e galactose. No metabolismo de aminoácidos foram encontrados 93 genes (3.86%), que compõem genes de biossíntese de aminoácidos como arginina, lisina, fenilalanina, tirosina e triptofano. Responsáveis pelo metabolismo de lipídios foram localizados 62 genes (2.57%). Além disso, também foram localizados 64 genes (2.65%) responsáveis pelo metabolismo de cofatores e vitaminas, dessas podemos destacar a biossíntese de folato (Tabela 1).

Figura 5. Mapa da anotação funcional do genoma de *E. faecium* isolado do mel.

Fonte: Autor, 2025

Estavam presentes também no genoma genes importantes para a caracterização da cepa de *E. faecium* com potencial probiótico (Tabela 1), como o gene entP, para a produção de bacteriocina e os genes resposta a estresse clpE e dps e da síntese de GABA , *gadC.*

Tabela 1. Genes de importância biotecnológica encontrados no genoma de *E. faecium* isolado do mel.

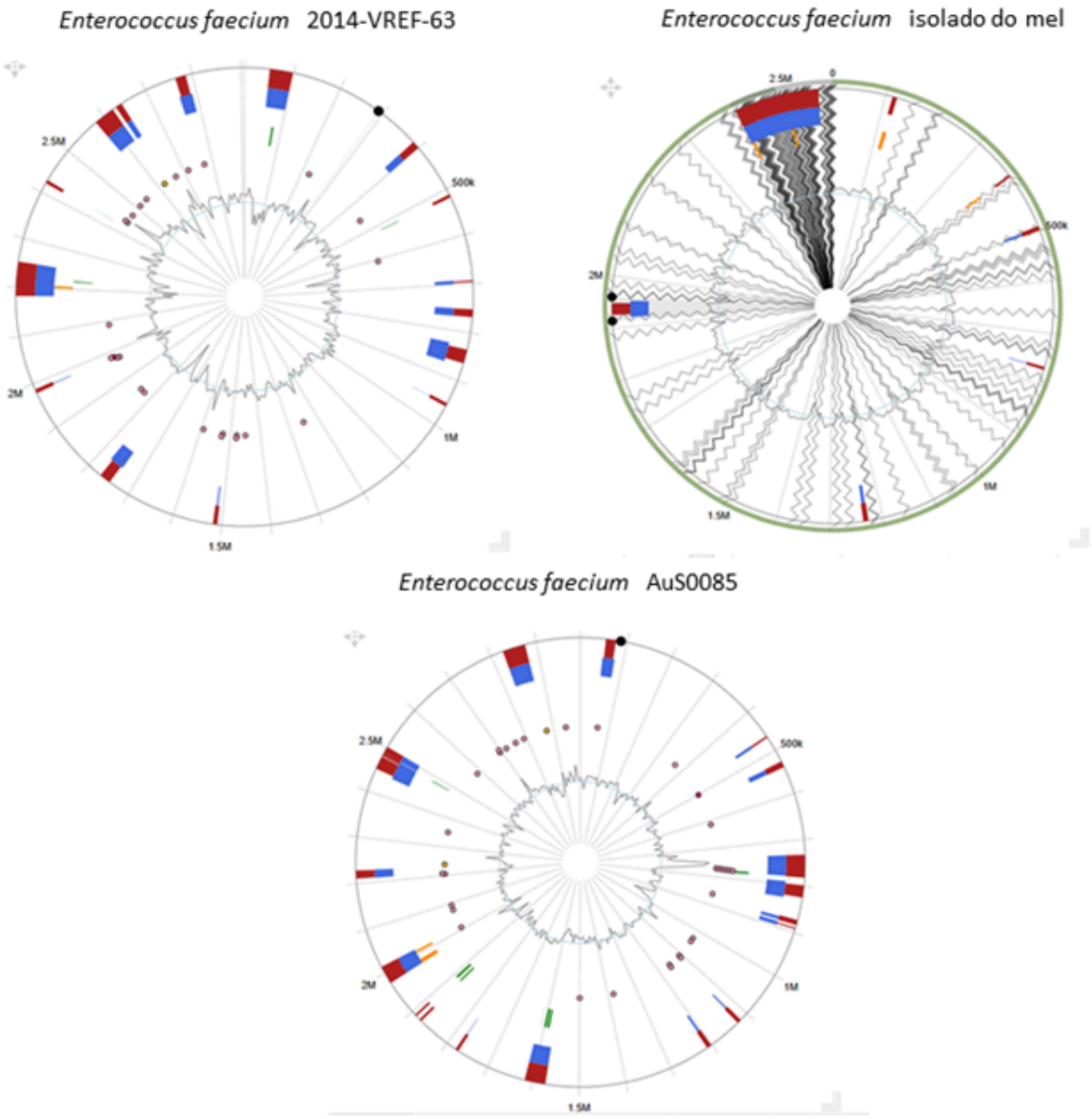
Gene	Proteína	Função
entP	Enterocina P	Atividade antimicrobiana.
folA	Dihidrofolato redutase (DHFR)	Síntese de folato.
folP	Dihidrofolato sintase	Síntese de folato.
clpE	Chaperona da família clp	Resistência a estresse como a presença bile.
dps	DNA-binding protein from starved cells	Resistência a estresse como a presença bile.
gadC	glutamato descarboxilase	Produção de GABA.

Fonte: Autor, 2025

5.2 Ilhas de patogenicidade, genes de resistência a antibióticos e genes de virulência

Não foram localizadas ilhas de patogenicidade no genoma de *E. faecium* isolado do mel (Figura 6), não estavam presentes genes de resistência ou patogenicidade, diferentemente do observado nas cepas de *E. faecium* testadas que tem a patogenicidade conhecida.

Figura 6. Ilhas de patogenicidade nos genomas de *E. faecium* isolado do mel e duas cepas de *E. faecium* patogênicas. Os círculos em rosa representam genes de resistência e os círculos em laranja representam genes associados à patogenicidade.



Fonte: Autor, 2025

No genoma de *E. faecium* isolado do mel estavam presentes quatro genes de resistência a antibióticos (Tabela 2), para a resistência a antibióticos aminoglicosídeos AAC(6')-Ii, intrínseco de bactérias lácticas, a forma mutada do gene eatA, denominado de eatAv, que confere resistência a pleuromutilina e o gene efrA, que confere resistência a macrolídeos,rifampicina. O gene vanY, de resistência a vancomicina também foi localizado, porém com baixo percentual de identidade.

Tabela 2. Genes de Resistencia a antibióticos encontrados no genoma.

Gene	start	stop	Identidade (%)	SNPs	Classe de antibiótico
AAC(6')-Ii	80.278	8.826	99.45	n.a	Aminoglicosídeo
vanY	74.904	75.728	34.9	n.a	Vancomicina
efrA	23.385	25.115	82.81	n.a	Macrolídeos, rifampicina
eatAv	37.279	38.781	98.8	T450I	Pleuromutilina

Fonte: Autor, 2025

Dos fatores de virulência pesquisados no genoma de *E. faecium* (Tabela 3), o isolado do mel apresentou apenas a presença não funcional do gene de adesão scm, também encontrado nos isolados probióticos. Diferentemente do isolado do mel e das cepas probióticas, os isolados patogênicos apresentaram muitos fatores de virulência.

Tabela 3. Fatores de virulência encontrados nos genomas de *Enterococcus faecium* , onde + Presente; − Ausente; * Não funcional devido à presença do códon de parada.

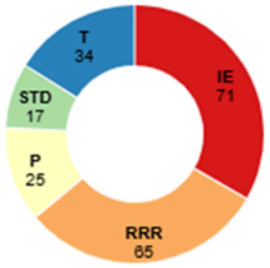
Propriedade			Probiótico		Patogênico	
CATEGORIA	GENES	Isolado do mel	T110	17OM39	DO	Aus004
Adesão	*acm*	-	*	*	+	+
	ebpA	-	-	-	+	+
	ebpC	-	-	-	+	+
	srtC	-	+	+	+	+
	ecbA	-	-	-	+	+
	efaA	-	+	+	+	+
	esp	-	-	-	-	+
	scm	*	*	*	+	+
	sgrA	-	-	-	+	+
Biofilm	*bopD*	-	*	*	+	+
Exoenzimas	*EF0818*	-	+	*	-	-

Fonte: Autor, 2025

5.3 Elementos genéticos móveis e presença de fagos

O software mobileOG-db identificou 212 genes classificados como elementos genéticos móveis (Figura 7), que incluem genes de fagos (25), genes de replicação/recombinação/reparo (65), integração/excisão (71) e estabilidade/transferência/defesa (17).

Figura 7. Elementos genéticos móveis presentes no genoma de *E.faecium* isolado do mel.

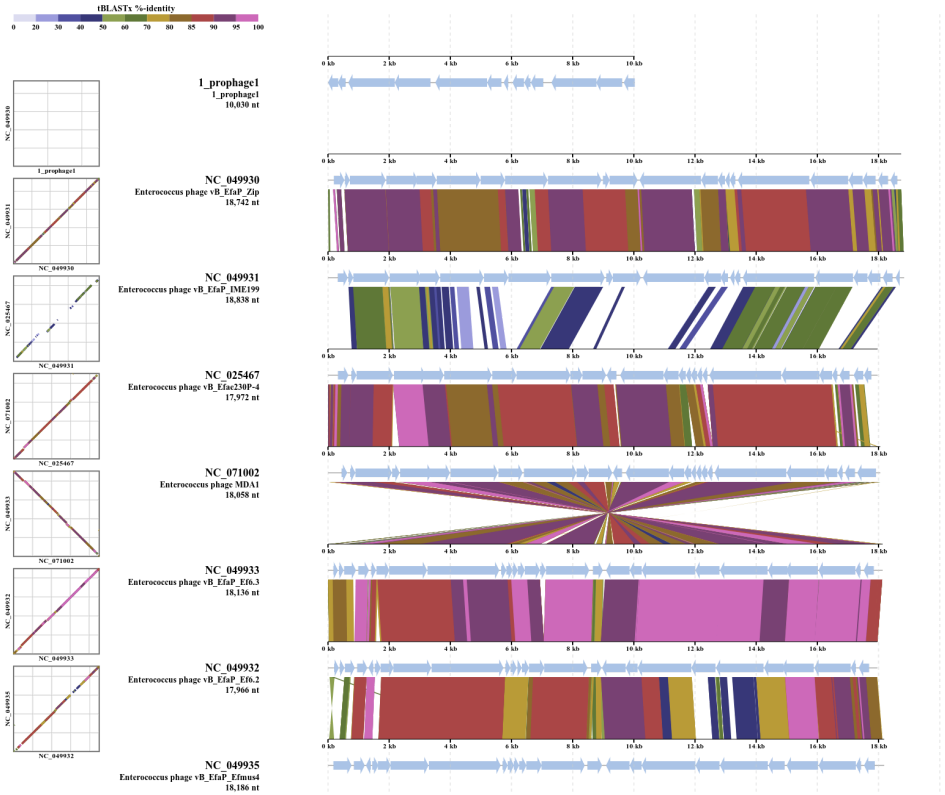


IE	Integração/excisão	71
RRR	Replicação/Recombinação/Reparo	65
P	Fago	25
STD	Estabilidade/transferência/defesa	17
T	Transferência	34
	Total	212

Fonte: Autor, 2025

Foram identificados genes de fagos presentes no genoma de *E. faecium* isolado do mel. Esse fago tem o genoma com o tamanho de 10kb (Figura 8), com genes para a síntese de proteínas estruturais do fago (cabeça-pescoço e capsídeo) e proteínas de replicação (endonucleases). Não foi possível identificar a família do vírus localizado e o alinhamento com outros fagos que infectam *E. faecium* não apresentou similaridade.

Figura 8. Alinhamento do genoma do fago encontrado no genoma de *E.faecium* isolado do mel com o genoma de fagos identificados no gênero *Enterococcus*.



Fonte: Autor, 2025

5.4 Teste de Susceptibilidade a Antibióticos

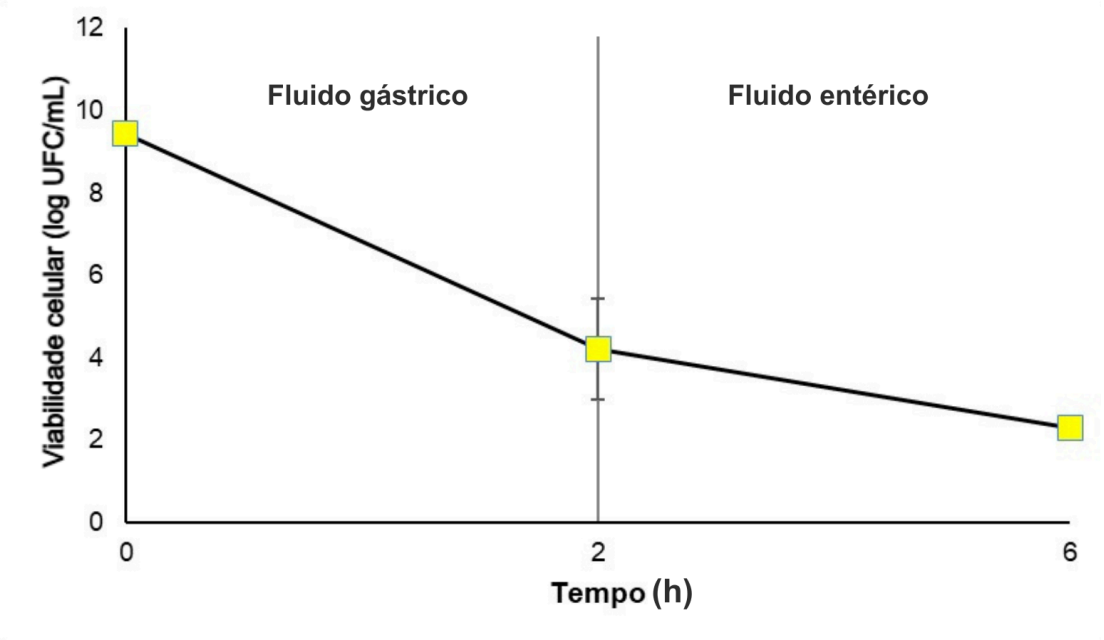
Tabela 4. Resultados da Concentração Mínima Inibitória (CIM) dos antibióticos, onde S = sensível

Antibiótico	**CIM**	**Interpretação**
Ampicilina	≤ 2 µl/ml	S
Estreptomicina	SIN-S	S
Gentamicina	SIN-S	S
Levofloxacina	4 µl/ml	S
Linezolida	2 µl/ml	S
Teicoplanina	≤ 0,5 µl/ml	S
Tigeciclina	≤ 0,12 µl/ml	S
Vancomicina	≤ 0,5 µl/ml	S

Fonte: Autor, 2025

5.5 Teste de Sobrevivência em Condições Gastrointestinais Simuladas *in Vitro*

Gráfico 1: Viabilidade das células da bactéria *Enterococcus faecium* cultivada em meio SYC, após exposição a fluidos gástricos e fluidos entéricos.



Fonte: Autor, 2025

A partir da observação do gráfico pode-se perceber que houve diferença estatística entre o tempo 0h e 2h, ou seja, a etapa gástrica afetou a sobrevivência celular, visto que houve uma queda de aproximadamente 5,22 log UFC/mL no número de células. E no tempo de 2h para 6h não houve diferença estatística, ou seja, a etapa intestinal não impactou na sobrevivência celular.

6 DISCUSSÃO

O isolado 58 foi obtido a partir de amostras de mel de uma espécie de abelha sem ferrão conhecida como abelha tubiba (*Scaptotrigona tubiba*) de uma colmeia localizada na zona urbana na cidade de Triunfo do sertão de Pernambuco. Diversos isolados obtidos desta amostra de mel perderam completamente a viabilidade após 2 anos do isolamento, o que não aconteceu com o isolado 58 despertando o interesse neste isolado. Em experimentos prévios, ele apresentou um padrão acidogênico em carboidratos como glicose e sacarose, mas foi incapaz de crescer na presença de etanol a 10% e em coloração de Gram se apresentou como um cocos Gram-positivo. Este padrão seria esperado para um bactéria ácido láctica como *Lactococcus sp* (Díez *et al*., 2017; Song *et al*., 2017). Contudo, os dados do sequenciamento apontaram que este isolado pertencia a espécie *E. faecium*, uma notória espécie de patógenos oportunistas em humanos, mas com alguns exemplos de linhagens probióticas (Krawczyk *et al*., 2021).

Habitualmente, *E. faecium* é encontrada como parte da microbiota entérica humana e de outros mamíferos, mas pode ser identificada também em amostras ambientais (Ben Braïek & Smaoui, 2019; Krawczyk *et al*., 2021). Dimov e colaboradores (2020), identificaram um linhagem de *E. faecium* em amostras de mel na Bulgária com um ST 286. Esta linhagem apresentou propriedades probióticas e biotecnológicas de interesse, como a produção de bacteriocinas contra *Paenibacillus larvae* (Dimov *et al*., 2020), um importante patógeno de abelha (Ebeling *et al*., 2016). Deste modo, emergiu o questionamento se o isolado 58 seria uma linhagem patogênica ou probiótica de *E. faecium*. Sendo uma linhagem patogênica, que teria tido acesso ao mel através de abelhas contaminadas, possivelmente durante o forrageio no pasto floral, este seria um sinal de alerta para os produtores e um risco de saúde pública (Cunningham *et al*., 2022; Grabowski & Klein, 2015). Por outro lado, se o isolado 58 for uma nova linhagem probiótica, este poderia ser utilizado na formulação de produtos derivados do mel, trazendo uma nova possibilidade nova para ao beneficiamento deste insumo, além da simples venda *in natura* (Abdelsamad *et al*., 2022; Mustar & Ibrahim, 2022). Deste modo, foram realizadas uma série de análises *in silico* e *in vitro* a fim de estimar a segurança no uso desta linhagem e eventuais propriedades probióticas.

A característica mais básica de uma linhagem probiótica é sua segurança

para o hospedeiro, o que é traduzido na ausência de fatores de virulência e genes de resistência a antimicrobianos (Markowiak & Śliżewska, 2017; Mendonça *et al*., 2022; Zendeboodi *et al*., 2020). No genoma da linhagem estudada não foram identificados genes de virulência relevantes, nem genes de resistência além dos que são encontrados codificados cromossomicamente. Estes dados contrastam com o esperado de uma linhagem patogênica, como *E. faecium 2014-VREF-63* e AuS0085, onde são observados uma abundância de ambos os tipos de genes distribuídos ao longo do genoma. Corroborando com os dados genômicos, o teste fenotípico de resistência a antimicrobianos confirmou a sensibilidade a todos os antimicrobianos testados. O único gene de patogenicidade encontrado, foi a adesina SCM, que auxilia na adesão ao colágeno (Hendrickx *et al*., 2009). Apesar de ser entendido como um fator de virulência, a capacidade de aderir às superfícies do hospedeiro também é um fator relevante para as linhagens probióticas, que precisam se estabelecer nas mucosas para induzir seu efeito probiótico (Nishiyama *et al*., 2015). Adicionalmente aos genes de virulência e os de resistência a antimicrobianos, foram identificados genes de elementos genéticos móveis, uma característica nem sempre desejável para um probiótico.

Elementos genéticos móveis incluem plasmídeos, transposons, sequências de inserção, integrons e prófagos (Vale, Lehours & Yamaoka, 2022; Weisberg & Chang, 2023). Todos esses elementos desempenham um papel crítico no processo de evolução dos genomas bacterianos e na sua adaptação a diversos ambientes (Weisberg & Chang, 2023). Os dados genômicos identificaram a presença de genes plasmidiais (categoria RRR – 65), genes de transposase (categoria T – 35), que podem estar relacionados a sequências de inserção ou transposons, genes de mecanismos de transposição tipo “copia e cola” (categoria IE – 71) e genes relacionados a prófagos (categoria P – 25). Elementos genéticos móveis não são desejáveis em cepas probióticas, por estarem relacionados a mobilização de genes de resistência ou de virulência/patogenicidade (Benler *et al*., 2021). Mas, como analisado previamente, o isolado 58 não apresenta genes nem de resistência nem de virulência que poderiam estabelecer uma associação indesejada com esses elementos genéticos. Adicionalmente, por ser um isolado obtido do meio ambiente, é possível que muitos desses elementos genéticos não tenham sido previamente descritos. Corroborando esta hipótese, a análise do prófago encontrado no genoma não permitiu identificá-lo entre os previamente descritos em *E. faecium*. Assim, é

possível que este prófago seja de um novo tipo, embora sejam necessárias análises mais aprofundadas. Deste modo, é possível que todos esses elementos genéticos identificados refletem o processo de adaptação do isolado 58 ao nicho ecológico onde foi encontrado, contribuindo para sua sobrevivência.

Contudo, as condições de estresses encontradas no meio ambiente são distintas das encontradas por probióticos (Castro-López *et al*., 2023). Linhagens probióticas precisam alcançar o intestino viáveis para se instalar e desenvolver seu efeito benéfico ao hospedeiro (Mendonça *et al*., 2022). Para isso é necessário sobreviver a uma série de condições muito singulares de estresse, como o estresse promovido pela passagem pelo estômago e da entrada no intestino (Castro-López *et al*., 2023). A fim de aferir a performance do isolado 58 frente a esses estresses, ele foi submetido ao teste de simulação do trato gastrintestinal. Neste ensaio foi observado uma drástica perda de viabilidade durante a simulação de fase gástrica, sugerindo uma sensibilidade desta linhagem ao estresse ácido. O mesmo não foi observado durante a simulação de fase intestinal, onde o isolado não demonstrou uma perda de viabilidade significativa. Este dado está de acordo com a presença de genes capazes de hidrolisar sais biliares, principal fonte de estresse nesta etapa (Kusada, Morinaga & Tamaki, 2021). Apesar da perda de viabilidade observada no ensaio, quantidades significativas de células chegam viáveis ao fim do experimento. Adicionalmente, este teste é realizado com células não adaptadas e completamente expostas aos estressores. Em formulações de produtos probióticos as células microbianas estarão revestidas por matrizes que comporão o produto e oferecem proteção (Kathiriya, Vekariya & Hati, 2023).

Deste modo, o principal desafio identificado neste estudo para o isolado 58 ser utilizado como uma linhagem probiótica é sua sobrevivência na passagem pelo estômago, uma das principais fontes de mortalidade durante a passagem pelo trato gastrintestinal (Bustos *et al*., 2025). A suplementação do meio com aminoácidos poderia auxiliar na sobrevivência deste isolado contra o estresse ácido, como observado em outras bactérias lácticas (Mendonça et al., 2019). Foram identificados através de mineração do genoma, os genes de 2 importantes mecanismos de proteção contra o estresse ácido. O primeiro mecanismo utiliza o glutamato, ele sofre uma descarboxilação redutiva que leva a produção de GABA e CO_2 e no processo consome um próton do meio e é processada pela glutamato descarboxilase (Bustos et al., 2025; Feehily & Karatzas, 2013). O segundo

mecanismo de proteção contra o estresse ácido é a via da arginina deiminase, que decompõem a arginina até ornitina e, no processo, produz 2 mol de amônia e consome 3 mol de prótons do citosol por mol de aminoácido consumido (Arena, Manca de Nadra & Muñoz, 2002; Bustos et al., 2025). Deste modo, a natureza da formulação dos produtos que empreguem o isolado 58 podem favorecer drasticamente sua viabilidade durante a passagem pelo estômago. Apenas formulações que empreguem suspensões celulares são desencorajadas pelos dados obtidos neste estudo.

Em conjunto, os dados obtidos neste estudo, apontam que o isolado 58 de *E. faecium* apresenta um potencial para ser empregado como um probiótico. Adicionalmente, tendo sido isolado do mel, um ambiente com altíssima pressão osmótica, é possível que esta linhagem tenha mecanismos de sobrevivência contra dessecação. Uma propriedade chave para formulações em fermentos secos (Mendonça *et al*., 2022). Além disso, esta linhagem produz uma biocina com atividade contra outras espécies de bactéria Gram-positivas, a enterocina P (Rouhani, 2021). Esta biocina, assim como a nisina, tem um potencial de aplicação como conservante natural de produtos e confere a propriedade probiótica de inibir o crescimento de patógenos alimentares humanos (Rouhani, 2021; Shin *et al*., 2016).

Por fim, os achados deste estudo demonstram que o isolado 58 é seguro para utilização em formulações alimentícias destinadas a humanos e animais e tem suporte nos dados para receber o status de probiótico. Contudo, ainda são necessários mais testes para consolidar as propriedades probióticas deste isolado, assim como para definir as melhores formulações de produtos lácteos que otimizem sua sobrevivência. No futuro, este isolada poderá integrar as opções disponíveis para o desenvolvimento de novos produtos, em particular derivados do mel, e contribuir para o processo de inovação local e regional.

7 CONCLUSÃO

A pesquisa apresentou uma análise do potencial biotecnológico de *Enterococcus faecium* isolado do mel como probiótico, uma vez que foi feita uma análise de seu genoma à procura de genes de resistência a antibióticos e ilhas de patogenicidade. Onde foi possível observar tanto a ausência de genes problemáticos, como a ausência de boa parte dos fatores de virulência que compõem as ilhas de patogenicidade. Além disso, os experimentos de sobrevivência celular em condições simuladas do trato gastrointestinal demonstra que o microrganismo é capaz de sobreviver nesse meio, sendo uma característica desejável para microrganismos probióticos. Os testes de sensibilidade a antimicrobianos também nos permitem identificar que o *E. faecium* isolado não apresenta resistência a antimicrobianos relevantes, corroborando com os dados obtidos pela análise genética e, consequentemente, não representando um risco para a saúde pública. Todos esses achados fortalecem a hipótese de que o isolado seja uma bactéria probiótica, no entanto mais testes são necessários para consolidar suas propriedades probióticas.

REFERÊNCIAS

ABDELSAMAD, N. O. et al. Evaluation of different bacterial honey isolates as probiotics and their efficient roles in cholesterol reduction. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 6, p. 106, 4 jun. 2022

AMUASI, G. R. et al. Enterococcus species: insights into antimicrobial resistance and whole-genome features of isolates recovered from livestock and raw meat in Ghana. **Frontiers in microbiology**, v. 14, p. 1254896, 2023.

ARAUJO, G. V. DE et al. Probiotics for the treatment of upper and lower respiratory-tract infections in children: systematic review based on randomized clinical trials. **Jornal de pediatria**, v. 91, n. 5, p. 413–427, 2015.

ARENA, M. E.; MANCA DE NADRA, M. C.; MUÑOZ, R. The arginine deiminase pathway in the wine lactic acid bacterium Lactobacillus hilgardii X1B: Structural and functional study of the arcABC genes. Gene, v. 301, n. 1–2, p. 61–66, 2002.

ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. **Nature reviews. Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 266–278, 2012.

AZAD, M. A. K. et al. Probiotic species in the modulation of gut Microbiota: An overview. **BioMed research international**, v. 2018, p. 9478630, 2018.

BEN BRAÏEK, O.; SMAOUI, S. Enterococci: Between Emerging Pathogens and Potential Probiotics. **BioMed Research International**, v. 2019, p. 1–13, 23 maio 2019.

BENLER, S. et al. Cargo Genes of Tn *7* -Like Transposons Comprise an Enormous Diversity of Defense Systems, Mobile Genetic Elements, and Antibiotic Resistance Genes. mBio, v. 12, n. 6, 21 dez. 2021.

BERTELLI, C. et al. IslandViewer 4: expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets. **Nucleic acids research**, v. 45, n. W1, p. W30–W35, 2017.

BHUNCHOTH, A. et al. Two asian jumbo phages, ϕRSL2 and ϕRSF1, infect Ralstonia solanacearum and show common features of ϕKZ-related phages. **Virology**, v. 494, p. 56–66, 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Instrução Normativa nº 284, de 7 de março de 2024.** Estabelece listas de ingredientes autorizados para suplementos alimentares. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, 11 mar. 2024. Disponível em: https://anvisalegis.datalegis.net/action/ActionDatalegis.php?acao=abrirTextoAto&link=S&tipo=INM&numeroAto=00000284&seqAto=000&valorAno=2024&orgao=DC/ANVISA/MS&cod_modulo=310&cod_menu=9431. Acesso em: [29/03/2024].

BROWN, C. L. et al. MobileOG-db: A manually curated database of protein families mediating the life cycle of bacterial mobile genetic elements. **Applied and environmental microbiology**, v. 88, n. 18, p. e0099122, 2022.

BURKHOLDER, P. R.; MCVEIGH, I. Synthesis of vitamins by intestinal bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 28, n. 7, p. 285–289, 1942.

BUSTOS, A. Y. et al. Recent Advances in the Understanding of Stress Resistance Mechanisms in Probiotics: Relevance for the Design of Functional Food Systems. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 17, n. 1, p. 138–158, 3 fev. 2025.

CASTRO-LÓPEZ, C. et al. Key Stress Response Mechanisms of Probiotics During Their Journey Through the Digestive System: A Review. Probiotics and Antimicrobial **Proteins**, v. 15, n. 5, p. 1250–1270, 24 out. 2023.

CUMMINGS, J. H.; MACFARLANE, G. T. Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. **Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)**, v. 16, n. 1, p. 3–11, 1997.

CUNNINGHAM, M. M. et al. Honey bees as biomonitors of environmental contaminants, pathogens, and climate change. **Ecological Indicators**, v. 134, p. 108457, jan. 2022.

DEVRIESE, L. A.; POT, B. The genus Enterococcus. Em: **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. Boston, MA: Springer US, 1995. p. 327–367.

DIECKMANN, M. A. et al. EDGAR3.0: comparative genomics and phylogenomics on a scalable infrastructure. **Nucleic acids research**, v. 49, n. W1, p. W185–W192, 2021.

DÍEZ, L. et al. Transcriptome analysis shows activation of the arginine deiminase pathway in Lactococcus lactis as a response to ethanol stress. **International Journal of Food Microbiology**, v. 257, p. 41–48, set. 2017.

DIMOV, S. G. et al. WGS-based characterization of the potentially beneficial Enterococcus faecium EFD from a beehive. **Molecular biology reports**, v. 47, n. 8, p. 6445–6449, 2020.

EBELING, J. et al. Biology of Paenibacillus larvae, a deadly pathogen of honey bee larvae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 17, p. 7387–7395, 9 set. 2016.

FAO; WHO. **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**; FAO: London, ON, Canada, 2002.

FEEHILY, C.; KARATZAS, K. A. G. Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 1, p. 11–24, jan. 2013.

FOULQUIÉ MORENO, M. R. et al. The role and application of enterococci in food and health. **International journal of food microbiology**, v. 106, n. 1, p. 1–24, 2006.

FRANZ, C. M.; HOLZAPFEL, W. H.; STILES, M. E. Enterococci at the crossroads of food safety? **International journal of food microbiology**, v. 47, n. 1–2, p. 1–24, 1999.

FREEMAN, H. J.; KIM, Y. S. Digestion and absorption of protein. **Annual review of medicine**, v. 29, n. 1, p. 99–116, 1978.

GARCÍA-SOLACHE, M.; RICE, L. B. The Enterococcus: A model of adaptability to its environment. **Clinical microbiology reviews**, v. 32, n. 2, 2019.

GHATTARGI, V. C. et al. Comparative genome analysis reveals key genetic factors associated with probiotic property in Enterococcus faecium strains. **BMC genomics**, v. 19, n. 1, p. 652, 2018.

GRABOWSKI, N. T.; KLEIN, G. Microbiology and Food-borne Pathogens in Honey. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 00–00, 15 jul. 2015.

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**, v. 38, p. 62–66, 2014.

HANCOCK, L. E.; MURRAY, B. E.; SILLANPÄÄ, J. Enterococcal cell wall components and structures. Em: **Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection**. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.

HENDRICKX, A. P. A. et al. SgrA, a Nidogen-Binding LPXTG Surface Adhesin Implicated in Biofilm Formation, and EcbA, a Collagen Binding MSCRAMM, Are Two Novel Adhesins of Hospital-Acquired *Enterococcus faecium*. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 11, p. 5097–5106, nov. 2009.

HILL, C. et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic: Expert consensus document. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506–514, 2014.

IMLAY, J. A. Where in the world do bacteria experience oxidative stress?: Oxidative stress in natural environments. **Environmental microbiology**, v. 21, n. 2, p. 521–530, 2019.

KATHIRIYA, M. R.; VEKARIYA, Y. V.; HATI, S. Understanding the Probiotic Bacterial Responses Against Various Stresses in Food Matrix and Gastrointestinal Tract: A Review. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 15, n. 4, p. 1032–1048, 22 ago. 2023.

KAYAOGLU, G.; ØRSTAVIK, D. Virulence factors of Enterococcus faecalis: relationship to endodontic disease. **Critical reviews in oral biology and medicine: an official publication of the American Association of Oral Biologists**, v. 15, n. 5, p. 308–320, 2004.

KONEMAN, Elmer W. **Koneman. Diagnóstico microbiológico: Texto e atlas**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

KRAWCZYK, B. et al. The Many Faces of Enterococcus spp.—Commensal, Probiotic and Opportunistic Pathogen. **Microorganisms**, v. 9, n. 9, p. 1900, 7 set. 2021.

KRISTICH, C. J.; RICE, L. B.; ARIAS, C. A. Enterococcal infection—treatment and antibiotic resistance. Em: **Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection**. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.

KURUGÖL, Z.; KOTUROĞLU, G. Effects of Saccharomyces boulardii in children with acute diarrhoea: Saccharomyces boulardii in children with acute diarrhoea. **Acta paediatrica (Oslo, Norway: 1992)**, v. 94, n. 1, p. 44–47, 2007.

KUSADA, H.; MORINAGA, K.; TAMAKI, H. Identification of Bile Salt Hydrolase and Bile Salt Resistance in a Probiotic Bacterium Lactobacillus gasseri JCM1131T. **Microorganisms**, v. 9, n. 5, p. 1011, 8 maio 2021.

LAM, M. M. C. et al. Comparative analysis of the first complete Enterococcus faecium genome. **Journal of bacteriology**, v. 194, n. 9, p. 2334–2341, 2012.

LAUKOVÁ, A. The genus Enterococcus, bacteria with beneficial and/or non-beneficial potential? Em: **Lactic Acid Bacteria**. Boca Raton: CRC Press, 2024. p. 84–101.

LEBLANC, J. G. et al. Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. **Current opinion in biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 160–168, 2013.

LEBRETON, F.; WILLEMS, R. J. L.; GILMORE, M. S. Enterococcus diversity, origins in nature, and gut colonization. Em: **Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection**. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.

LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms. **Science (New York, N.Y.)**, v. 147, n. 3659, p. 747–748, 1965.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B. C. Yogurt as probiotic carrier food. **International dairy journal**, v. 11, n. 1–2, p. 1–17, 2001.

LUCENA, B. T. L. et al. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. **BMC microbiology**, v. 10, n. 1, p. 298, 2010

MARKOWIAK, P.; ŚLIŻEWSKA, K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. **Nutrients**, v. 9, n. 9, p. 1021, 15 set. 2017.

MASCARENHAS, Y. V. C. et al. Estudo in silico Das linhagens DE Enterococcus faecium: Análise pangenômica e predição DE alvos vacinais e DE fármacos. **Hematology, transfusion and cell therapy**, v. 45, p. S837, 2023.

MCARTHUR, A. G. et al. The comprehensive antibiotic resistance database. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 7, p. 3348–3357, 2013.

MENDONÇA, A. A. et al. *Lactobacillus vini*: Mechanistic response to stress by medium acidification. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 165, n. 1, p. 26–36, 2019.

MENDONÇA, A. A. et al. Journey of the Probiotic Bacteria: Survival of the Fittest. **Microorganisms**, v. 11, n. 1, p. 95, 30 dez. 2022

MILLER, W. R.; MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 12, n. 10, p. 1221–1236, 2014.

MORLON-GUYOT, J. et al. Lactobacillus manihotivorans sp. nov., a new starch-hydrolysing lactic acid bacterium isolated during cassava sour starch fermentation. **International journal of systematic bacteriology**, v. 48 Pt 4, n. 4, p. 1101–1109, 1998.

MUSTAR, S.; IBRAHIM, N. A Sweeter Pill to Swallow: A Review of Honey Bees and Honey as a Source of Probiotic and Prebiotic Products. **Foods**, v. 11, n. 14, p. 2102, 15 jul. 2022.

NISHIYAMA, K. et al. Adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* mucus-binding factor to mucin and extracellular matrix proteins. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 79, n. 2, p. 271–279, 1 fev. 2015.

OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Probiotics: an overview of beneficial effects. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 82, n. 1–4, p. 279–289, 2002.

PADILHA, M. **Queijo petit-suisse probiótico e simbiótico: características tecnológicas e emprego de técnicas dependentes e independentes de cultivo na avaliação da sobrevivência dos probióticos no produto e em ensaios de sobrevivência in vitro**. [s.l.] Universidade de São Paulo, Agência USP de Gestão da Informação Académica (AGUIA), 2015.

PALMER, K. L.; KOS, V. N.; GILMORE, M. S. Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. **Current opinion in microbiology**, v. 13, n. 5, p. 632–639, 2010.

REAL ROCHA, K. ANÁLISE GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DE Enterococcus spp. PROVENIENTES DE AMOSTRAS CLÍNICAS E DE ALIMENTO. **Brazilian Journal of Surgery & Clinical Research**, v. 23, n. 1, 2018.

RITA, F. **Influência da composição da matriz alimentar na viabilidade do Lactobacillus acidophilus La-5 em sobremesa de soja aerada simbiótica. 2014. 50 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos)**. Ponta Grossa: [s.n.].

ROUHANI, A. A Comparison of Antibacterial Properties of Tachyplesin, Thanatin, and Enterocin P on Enterococcus faecalis. **European Endodontic Journal**, 2021.

SANTOS, D. DA S. et al. What differentiates probiotic from pathogenic bacteria? The genetic mobility of Enterococcus faecium offers new molecular insights. **Omics: a journal of integrative biology**, v. 24, n. 12, p. 706–713, 2020.

SAVA, I. G.; HEIKENS, E.; HUEBNER, J. Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. **Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 533–540, 2010.

SEEMANN, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 30, n. 14, p. 2068–2069, 2014.

SHIN, J. M. et al. Biomedical applications of nisin. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, n. 6, p. 1449–1465, jun. 2016.

SONG, A. A. L. et al. A review on Lactococcus lactis: From food to factory. **Microbial Cell FactoriesBioMed Central** , 2017.

STARIKOVA, E. V. et al. Phigaro: high-throughput prophage sequence annotation. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 36, n. 12, p. 3882–3884, 2020.

SUN, H. et al. Salivary secretory immunoglobulin (SIgA) and lysozyme in malignant tumor patients. **BioMed research international**, v. 2016, p. 8701423, 2016.

TEIXEIRA, L. M. et al. Enterococcus. Em: **Manual of Clinical Microbiology**. Washington, DC, USA: ASM Press, 2015. p. 403–421.

VALE, F. F.; LEHOURS, P.; YAMAOKA, Y. Editorial: The Role of Mobile Genetic Elements in Bacterial Evolution and Their Adaptability. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 21 fev. 2022.

VAN TYNE, D.; GILMORE, M. S. Friend turned foe: evolution of enterococcal virulence and antibiotic resistance. **Annual review of microbiology**, v. 68, n. 1, p. 337–356, 2014.

VINDEROLA, G. et al. (EDS.). **Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects**. 6. ed. Londres, England: CRC Press, 2024.

WEISBERG, A. J.; CHANG, J. H. Mobile Genetic Element Flexibility as an Underlying Principle to Bacterial Evolution. **Annual Review of Microbiology**, v. 77, n. 1, p. 603–624, 15 set. 2023.

WILLEMS, R. J. L. et al. Restricted Gene Flow among Hospital Subpopulations of Enterococcus faecium. **mBio**, v. 3, n. 4, 2012.

ZENDEBOODI, F. et al. Probiotic: conceptualization from a new approach. **Current Opinion in Food Science**, v. 32, p. 103–123, abr. 2020.