

POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO *Bacillus* sp. SMIA-2 SOBRE
BACTÉRIAS ISOLADAS EM CENTRO CIRÚRGICO VETERINÁRIO

PAULO SÉRGIO CRUZ DE ANDRADE JÚNIOR

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO - 2021

POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO *Bacillus* sp. SMIA-2 SOBRE
BACTÉRIAS ISOLADAS EM CENTRO CIRÚRGICO VETERINÁRIO

PAULO SÉRGIO CRUZ DE ANDRADE JÚNIOR

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Produção Vegetal”

Orientador: Prof^a Meire Lelis Leal Martins

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO - 2021

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

A553 Andrade Junior, Paulo Sergio Cruz de.

Potencial antimicrobiano do *Bacillus* sp. SMIA-2 sobre bactérias isoladas em centro cirúrgico veterinário / Paulo Sergio Cruz de Andrade Junior. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2021.

78 f. : il.

Bibliografia: 58 - 62.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2021.
Orientadora: Meire Lelis Leal Martins.

1. infecção hospitalar. 2. detergente enzimático. 3. antibióticos. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO *Bacillus* sp. SMIA-2 SOBRE
BACTÉRIAS ISOLADAS EM CENTRO CIRÚRGICO VETERINÁRIO

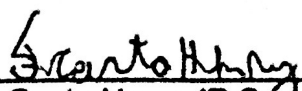
PAULO SÉRGIO CRUZ DE ANDRADE JÚNIOR

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Produção Vegetal”

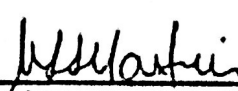
Aprovada em 30 de março de 2021

Comissão Examinadora:


Prof.ª Silvia Menezes de Faria Pereira (D.Sc., Eng. e Ciências Materiais) – UENF


Prof. Fábio da Costa Henry (D.Sc., Medicina Veterinária) – UENF


Prof. Alexandre Cristiano Santos Júnior (D.Sc., Ciência Animal) – Ifes/Alegre


Prof.ª Meire Leis Leal Martins (Ph.D., Molecular Biology and Biotechnology) –
UENF (Orientadora)

Às minhas filhas: Marina e Manuela.

AGRADECIMENTO

Ao Instituto Federal do Espírito Santo – Campus de Alegre e a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro pela oportunidade de realizar o curso de doutorado;

À Professora Meire Lelis Leal Martins pela orientação, paciência, dedicação e conhecimentos transmitidos durante o curso;

Ao Professor Fábio da Costa Henry e à Dra. Sílvia Menezes de Faria Pereira por terem aceitado participar de todas as etapas de avaliação e contribuírem para o desenvolvimento desse trabalho;

Ao Professor Alexandre Cristiano Santos Júnior pela ajuda e dedicação durante os experimentos e transmissão de conhecimentos teóricos e práticos, imprescindíveis para a realização desse trabalho;

A Samara Pinto Custódio Bernardo pelo carinho, companheirismo e ajuda durante a realização dos experimentos;

A Erica Cruz pelo carinho e companheirismo;

A Gilberto Aparecido Saldanha pela ajuda na realização da parte experimental;

Ao amigo Pedro Pierro de Mendonça pelo incentivo e colaboração nas análises estatísticas;

Aos colegas do Dinter Ifes/UENF, em especial, Priscilla Cortizo Costa Pierro e Raphael Pires Bolzan, pelo companheirismo durante o curso;

Às minhas filhas, Marina e Manuela, por entenderem a minha distância e por me fazerem feliz pelo simples fato de existirem. Sem vocês, a minha vida não seria completa. Amo vocês!

A Diana Paula Diogo Correia pela ajuda na formatação desse trabalho, pelo incentivo e por seguir ao meu lado, mesmo em momentos difíceis. Sua presença é um grande presente em minha vida. Amo você!

Aos meus amigos Américo Galaxe, Carlos Christo Coutinho da Silva, Diogo Benchimol, Marcos Lesqueves e Rafael Loures pelo apoio;

À minha família pelo incentivo constante;

A todos que, mesmo não mencionados, contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

Obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E NOMENCLATURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Infecções hospitalares	4
2.2 Bactérias isoladas em ambientes veterinários.....	7
2.3 Resistência bacteriana a antimicrobianos.....	10
2.4 <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2	16
2.5 Biofilmes bacterianos.....	18
2.6 Detergentes enzimáticos no reprocessamento de produtos para a saúde ..	20
3 TRABALHOS	22
3.1 Antimicrobial effect of the <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 and conventional antibiotics on bacteria isolated of a veterinary surgical center.....	22
3.2 Remoção de biofilmes de <i>Staphylococcus aureus</i> isolado em centro cirúrgico veterinário por enzimas de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2	44

4 RESUMO E CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Bactérias isoladas em ambiente e infecções hospitalares de hospitais veterinários.....	7
Quadro 2. Mecanismos de resistência a antimicrobianos por bactérias.	12
Quadro 3. Microrganismos isolados em hospitais veterinários e resistência a antimicrobianos.	15

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas da formação dos biofilmes	20
Figura 2. A. Células de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 em culturas submersas contendo farinha da casca de maracujá, água de maceração de milho e minerais após 72 h de incubação a 50°C (CRUZ, 2017). B. Micrografia Eletrônica de Transmissão (TEM) mostrando célula flagelada e endósporo elipsoidal (BERNARDO et al., 2020).....	18

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E NOMENCLATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHI	Brain Heart Infusion
APHA	American Public Health Association
ICC	Infecção de sítio cirúrgico
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	Potencial Hidrogeniônico
SMIA-2	<i>Bacillus</i> sp. SMIA-2
TSA	Tryptone Soya Agar
TSB	Tryptone Soya Broth

RESUMO

ANDRADE JÚNIOR, Paulo; D.Sc. Produção Vegetal. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março de 2021. Potencial antimicrobiano do *Bacillus* sp. SMIA-2 sobre bactérias isoladas em centro cirúrgico veterinário. Orientadora: Prof.^a Ph.D. Meire Lelis Leal Martins.

Infecções provocadas por bactérias são causas de mortalidade em pacientes da medicina humana e veterinária. Entre os fatores que propiciam a patogenicidade desses microrganismos, destacam-se: resistência a antimicrobianos, capacidade de sobreviver durante longos períodos e formação de biofilmes em superfícies. A identificação desses microrganismos em ambientes hospitalares e a busca por novos medicamentos eficazes devem ser uma preocupação constante, assim como métodos e produtos mais eficazes para limpeza de equipamentos hospitalares e remoção de biofilmes. As enzimas presentes em produtos de limpeza, principalmente as proteases, desempenham um papel importante na remoção de biofilmes microbianos, uma vez que desestabilizam as proteínas, polissacarídeos, lipídios e outras substâncias que fazem parte da sua composição. Algumas bactérias do gênero *Bacillus* sp. possuem a capacidade de produzir substâncias antimicrobianas e enzimas com potencial destruição de biofilmes. O *Bacillus* sp. SMIA-2 é uma bactéria termófila, produtora de endósporos e enzimas hidrolíticas termoestáveis, incluindo proteases, cujo ressequenciamento foi realizado, revelando seu potencial como produtor de substâncias antimicrobianas. Os objetivos desse trabalho foram: avaliar a atividade antimicrobiana do *Bacillus* sp. SMIA-2 sobre bactérias isoladas em um

centro cirúrgico veterinário e investigar a eficácia das enzimas produzidas pelo *Bacillus* sp. SMIA sobre o biofilme formado em superfície de aço inoxidável AISI 304, por *Staphylococcus aureus* isolado. As bactérias isoladas foram: *Bacillus* sp. (Gram-positivo), *Enterococcus* sp., *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Com exceção do *Staphylococcus epidermidis*, pelo menos uma das amostras das bactérias isoladas apresentou resistência antimicrobiana aos antibióticos comerciais. O *Bacillus* sp. SMIA-2 apresentou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. As enzimas do *Bacillus* sp. SMIA-2 foram eficientes na redução do biofilme formado, com redução de 10000 vezes o valor de UFC.cm² com o T2 (solução tampão + enzimas do *Bacillus* sp. SMIA-2) e remoção total do biofilme com o T5 (solução detergente + enzimas do *Bacillus* sp. SMIA-2). Portanto, o *Bacillus* SMIA-2 teve ação antimicrobiana sobre bactérias isoladas em um centro cirúrgico veterinário e seu complexo enzimático poderá ser utilizado para o desenvolvimento de detergente para higienização de superfícies de aço inoxidável AISI 304.

Palavras-chave: Infecção hospitalar, detergente enzimático, antibióticos.

ABSTRACT

ANDRADE JÚNIOR, Paulo; D.Sc. Vegetal Production. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. March, 2021. Antimicrobial potential of *Bacillus* sp. SMIA-2 on bacteria isolated in a surgical center. Advisor: Prof.^a Ph.D. Meire Lelis Leal Martins.

Bacterial infections are causes of mortality in patients of human and veterinary medicine. Among the factors that favor the pathogenicity of these microorganisms, the following stand out: resistance to antimicrobials, the ability to survive for long periods and the formation of biofilms on surfaces. The identification of these microorganisms in hospital environments and the Search for new effective drugs should be a constant concern, as well as more effective methods and products for cleaning hospital equipment and removing biofilms. The enzymes in cleaning products, especially proteases, play an important role in removal of microbial biofilms, since they destabilize the proteins, polysaccharides, lipids and other substances that are part of their composition. Some bacteria of the genus *Bacillus* sp. have the ability to produce antimicrobial substances and enzymes with potential destruction of biofilms. *Bacillus* sp. SMIA-2 is a thermophilic bacterium, producer of endospores and thermostable hydrolytic enzymes, including proteases, which resequencing has been carried out, revealing its potential as a producer of antimicrobial substances. The objectives of this work were: to evaluate the antimicrobial activity of *Bacillus* sp. SMIA-2 on isolated bacteria in a veterinary surgical center and to investigate the effectiveness of enzymes produced by *Bacillus* sp. SMIA-2 on the biofilm formed on AISI 304 stainless steel surface, by

isolated *Staphylococcus aureus*. The isolated bacteria were: *Bacillus* sp. (Gram positive), *Enterococcus* sp., *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. With the exception of *Staphylococcus epidermidis*, at least one of the samples of the isolated bacteria showed antimicrobial resistance to commercial antibiotics. *Bacillus* sp. SMIA-2 showed antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. The enzymes of *Bacillus* sp. SMIA-2 were efficient in reducing the biofilm formed, with a reduction of 10,000 times the value of UFC.cm² with T2 (buffer solution + enzymes from *Bacillus* sp. SMIA-2) and total removal of the biofilm with T5 (detergent solution + enzymes from *Bacillus* sp. SMIA-2). Therefore, *Bacillus* SMIA-2 had antimicrobial action on isolated bacteria in a veterinary surgical center and its enzyme complex can be used for the development of detergent for cleaning AISI 304 stainless steel surfaces.

Keywords: Nosocomial infection, disinfection, antibiotics.

1. INTRODUÇÃO

Na medicina veterinária, infecções hospitalares prejudicam o bem-estar animal, causam danos emocionais e perdas econômicas aos proprietários desses pacientes, já que alguns possuem alto valor comercial.

Entretanto, o combate a microrganismos causadores de infecções hospitalares continua sendo um desafio em unidades de serviço de saúde.

As causas de infecção hospitalar e sua prevenção dependem de vários fatores, como higienização, ventilação, paramentação adequada da equipe e controle do fluxo de pessoas (Moraes et al., 2012). Em hospitais e clínicas veterinárias o contato é a forma mais comum de transmissão de microrganismos a partir de uma fonte ambiental ou de outros pacientes. Porém, durante procedimentos cirúrgicos, o contato também pode ser responsável pela transmissão de microrganismos provenientes de fontes naturais de bactérias do paciente, tais como pele e nasofaringe, para a ferida cirúrgica (Schulz, 2014), causando a infecção do sítio cirúrgico (ISC). Apesar de existirem poucos dados na medicina veterinária, Arias e colaboradores (2013) encontraram taxas médias de ISC em torno de 7,96%.

Vários microrganismos são responsáveis pelas infecções hospitalares, e sabe-se que as superfícies atuam como reservatórios desses microrganismos em infecções cirúrgicas, contribuindo para o aumento da transmissão de patógenos hospitalares e risco de contaminação cruzada pelo contato indireto com o paciente. (Medeiros et al., 2003; Andrade et al., 2007; Santos et al., 2007; Garrett

et al., 2008; Ferreira et al., 2011; Arias et al., 2013; Avancini e Gonzáles, 2014; Bazílio et al., 2016).

No ambiente hospitalar, humano e veterinário, cepas de bactérias de *Staphylococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* foram isoladas e apresentaram resistência a antimicrobianos utilizados rotineiramente, como: penicilina, vancomicina, clindamicina, oxacilina, sulfametoxazol + trimetoprim, cloranfenicol, cefalexina, cefoxima, enrofloxacin, ciprofloxacina, entre outros. (Santos et al, 2007; Arias et al, 2013; Bazílio et al, 2016).

Para reduzir esses riscos, há uma necessidade urgente de alternativas sustentáveis e eficazes para novos produtos químicos de limpeza, desinfecção e higienização de ambientes e superfícies, afim de controlar a carga de bactérias patogênicas (Vandini et al., 2014).

A limpeza do ambiente é um fator determinante para diminuição da contaminação, como relatado por Rossi e colaboradores (2008), que observaram a influência de fluidos biológicos no prolongamento da sobrevivência do *Staphylococcus aureus*, a exemplo do sangue, o qual pode preservar a viabilidade dessa bactéria por até 60 dias.

Tendo em vista a contaminação ambiental por essas bactérias patogênicas e formadoras de biofilmes, diversos sanitizantes e antissépticos têm sido estudados com o objetivo de eliminar esses microrganismos. Porém, a capacidade de formação de biofilme em superfícies dificulta ou limita a ação de alguns desses produtos.

Entre os produtos utilizados para remoção do biofilme em superfícies, destacam-se os detergentes que contêm enzimas em sua composição (Lister e Horswill, 2014; Stiefel et al., 2016). Nesse sentido, a inclusão de enzimas nos produtos de limpeza facilita o destacamento do biofilme, que protege os microrganismos, permitindo uma maior eficácia dos agentes de limpeza. Com o aumento da prevalência da resistência aos antibióticos, enzimas antimicrobianas que visam à ruptura da maquinaria celular bacteriana e à formação de biofilme estão sob intensa investigação (De Cesare et al., 2019). A eficácia dos detergentes enzimáticos na remoção da carga microbiana e/ou biofilme e outras sujidades, recomendando-os para o reprocessamento de produtos para a saúde foi relatada por Centurión et al. (2019).

Enzimas são catalisadores biológicos, de natureza principalmente proteica, que catalisam reações químicas nas células de organismos vivos e são específicas para um determinado substrato. As enzimas de origem microbiana são atualmente as mais utilizadas industrialmente pela capacidade de produção em larga escala com um menor custo.

Bacillus sp. SMIA-2, uma bactéria termofílica isolada de amostras de solo, revelou-se excelente produtor de várias enzimas hidrolíticas, incluindo proteases (Ladeira et al., 2010; Barbosa et al., 2014), amilases (Corrêa et al., 2011) e celulases (Ladeira et al., 2015, Costa et al., 2017), quando cultivada em culturas submersas contendo resíduos agroindustriais como substratos. A boa atividade apresentada pelas enzimas produzidas pelo SMIA-2 em uma ampla faixa de valores de pH, boa estabilidade e atividade a temperaturas relativamente elevadas, boa estabilidade na presença de diversos tensoativos, agentes oxidantes e detergentes disponíveis localmente indicou o potencial dessa bactéria e de suas enzimas para uso em diversas aplicações industriais, inclusive na indústria de detergentes. Recentemente foi evidenciada a presença de genes responsáveis pela produção de compostos bioativos como a lichenisina, que tem propriedades biosurfactantes (Bernardo et al., 2020), que são compostos antimicrobianos tipicamente ativos contra patógenos bacterianos Gram-positivos, mas alguns exibem atividade contra patógenos bacterianos Gram-negativos, bem como patógenos fúngicos.

Considerando que *Bacillus sp.* SMIA-2 produz uma ampla gama de sistemas enzimáticos hidrolíticos e metabólitos, que têm efeitos antagônicos em outros microrganismos e é capaz de formar esporos extremamente resistentes, os objetivos deste trabalho foram avaliar a ação antimicrobiana de *Bacillus sp.* SMIA-2 sobre bactérias isoladas de centro cirúrgico veterinário e estudar o potencial do complexo enzimático na remoção de biofilmes de *Staphylococcus aureus* em superfícies de aço inoxidável.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Infecções hospitalares

Segundo a Portaria n° 2616, de 12 de maio de 1998 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 1998), Infecção hospitalar é aquela adquirida após a admissão do paciente e que se manifesta durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares.

A infecção do sítio cirúrgico (ISC), por sua vez, refere-se a uma infecção na parte do corpo onde foi realizada a cirurgia. Essas infecções podem ser superficiais, quando envolvem apenas a pele, mas podem ser mais graves quando envolvem tecidos subcutâneos, órgãos ou materiais implantados (OMS, 2016).

Na medicina humana, políticas de controle de infecção hospitalar têm sido desenvolvidas nas últimas décadas. No Brasil, as estratégias de combate às infecções hospitalares são determinadas pela Portaria n° 2616 de 12 de maio de 1998 (BRASIL, 1998), a qual estabelece o Programa de Controle de Infecções Hospitalares (PCIH), que é um conjunto de ações desenvolvidas deliberado e sistematicamente com vistas à redução máxima possível da incidência e da gravidade das infecções hospitalares.

Na medicina veterinária não existe um programa determinado para avaliação das taxas de infecções hospitalares e os dados sobre o assunto são escassos e pontuais.

A infecção hospitalar atinge todo o mundo e representa uma das causas de morte em pacientes hospitalizados (BRASIL, 2004). Entretanto, os índices de infecção hospitalar variam significativamente e estão diretamente relacionados com o nível de atendimento e complexidade de cada hospital. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (BRASIL, 2017), em humanos, as ISC são as complicações mais comuns decorrentes do ato cirúrgico, que ocorrem no pós-operatório em cerca de 3 a 20% dos procedimentos realizados, tendo um impacto significativo na morbidade e mortalidade dos pacientes. Esses dados são confirmados por Medeiros e colaboradores (2003), os quais observaram que dos 3120 pacientes operados entre janeiro de 1999 e outubro de 2002, 187 desenvolveram infecção cirúrgica (5,99%) e dessas infecções, a maior incidência ocorreu na ferida operatória, correspondendo a uma taxa de 3,7%. Poveda e colaboradores (2003) encontraram taxa de 13,4% de ISC em gastrocirurgias, que são procedimentos potencialmente contaminados. Entretanto, Petter e colaboradores (2013) relatam valores de 1,53% de ISC em cirurgias cesáreas, valores abaixo do estimado pela ANVISA.

Schulz (2014) relata que na medicina veterinária as fontes de contaminação são numerosas, no entanto a equipe hospitalar, instrumentos contaminados e o meio ambiente são fatores prováveis de infecção hospitalar. Segundo o autor, as fontes podem ser divididas ainda em: fontes animais, que são provenientes dos pacientes e incluem cabelo, nasofaringe e outras, tais como orifício anal e vaginal e fontes inanimadas, sendo as principais os objetos contaminados, que incluem a estrutura hospitalar, móveis, equipamentos, implantes e equipamentos de limpeza e o fluxo de ar. Andrade et al. (2007), por sua vez, consideram como causas de infecção em hospitais veterinários o mau uso da antibioticoterapia, aumento do número de pacientes hospitalizados suscetíveis à infecção, o uso de técnicas violentas de terapêuticas e diagnósticos, o grande número de pessoas lidando com o mesmo paciente, a contratação de pessoal auxiliar destreinado para a prevenção de infecções, projetos de arquitetura hospitalar inadequados e condições sanitárias impróprias.

As causas de infecção hospitalar e sua prevenção dependem de vários fatores, tais como limpeza adequada do ambiente, ventilação adequada, paramentação adequada da equipe e controle do fluxo de pessoas (MORAES et al., 2012). Santos e colaboradores (2010) declaram ainda que os esforços para diminuir os riscos de infecções hospitalares incluem programas apropriados de desinfecção de superfícies, móveis, equipamentos e área física, além da antissepsia adequada das mãos.

O ambiente hospitalar deve ser rotineiramente monitorado quanto à presença de microrganismos oportunistas e patogênicos, visto que pacientes hospitalizados são mais suscetíveis aos processos infecciosos devido a imunossupressão ou outras enfermidades debilitantes. Acúmulo de bactérias resistentes em hospitais e o aumento de infecções bacterianas têm sido acentuados por procedimentos cirúrgicos prolongados e extensos, aumento da capacidade de invasão das medidas de apoio, hospitalização prolongada, uso inadequado de antibióticos, falta de conformidade com as políticas de prevenção de infecção no pós-operatório, aumento da sobrevivência dos pacientes geriátricos e debilitados e uso de imunossupressores (Willard e Schulz, 2004).

Andrade e colaboradores (2007) estudaram a frequência de bactérias isoladas no ambiente, em feridas cirúrgicas, em médicos veterinários, enfermeiros e auxiliares de enfermagem em um hospital veterinário e concluíram que tanto o ambiente quanto os profissionais podem desempenhar papel importante nas infecções.

A limpeza do ambiente é um fator determinante para diminuição da contaminação, como relatado por Rossi e colaboradores (2008), que observaram a influência de fluidos biológicos no prolongamento da sobrevivência do *Staphylococcus aureus*, a exemplo do sangue, o qual pode preservar a viabilidade dessa bactéria por até 60 dias.

Sfaciotte e colaboradores (2014), ao determinar pontos críticos de contaminação e avaliação de protocolos de desinfecção hospitalar em um hospital veterinário, verificaram que na avaliação microbiológica, as contagens de colônias encontravam-se acima dos limites determinados pela American Public Health Association (APHA), que considera como aceitáveis a contaminação do ar em ambientes hospitalares menores que 30 UFC/cm² e de superfícies com contagem inferior a 2 UFC/cm². Santos e colaboradores (2010) encontraram valores de

contaminação do ar entre 3 e 15 UFC/cm² antes da desinfecção e de 4 UFC/cm² após a desinfecção, ou seja, parâmetros adequados às normas determinadas pela APHA, mas os autores observaram a presença de bactérias com multirresistência, fato que pode acarretar dificuldades no tratamento dos pacientes.

2.2 Bactérias isoladas em ambientes veterinários

Diversas bactérias, tanto oportunistas quanto patogênicas, possuem potencial de desencadear infecções hospitalares. Estudos na medicina humana e veterinária têm demonstrado a presença de um variado número desses microrganismos em instalações, equipamentos, profissionais e pacientes. Em trabalhos sobre a incidência de bactérias no ambiente hospitalar, diversos autores citam bactérias de diferentes gêneros e espécies, entre elas são relatadas a presença de *Streptococcus sp.*, *Enterobacter sp.*, *Escherichia coli*, *Proteus sp.*, *Klebsiela sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus sp.* (Andrade et al., 2007; Santos et al., 2010; Avancini e Gonzáles, 2014; Bazílio et al., 2016). Os gêneros e espécies encontradas em hospitais veterinários, bem como a fonte de contaminação encontram-se no Quadro 1.

Quadro 1. Bactérias isoladas em hospitais veterinários.

Microrganismo	Local do diagnostico	Autores
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ambiente hospitalar veterinário	SANTOS et al. (2010)
	Centro cirúrgico de grandes animais	BAZÍLIO et al. (2016)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Ambiente hospitalar veterinário	SANTOS et al. (2010)

Quadro 1, Cont.

<i>Staphylococcus coagulase (-)</i>	Mesa de procedimentos em setor de internação, Mesa de fluidoterapia, Mesa de pré-operatório, mesa cirúrgica, mesa de atendimento clínico	AVANCINI e GONZÁLES (2014)
	Sala cirúrgica, mesas cirúrgicas, mesas ambulatoriais e de enfermagem, boxes de isolamento, mãos de médicos veterinários, enfermeiros e auxiliares de enfermagem, orofaringe de médicos veterinários, enfermeiros e auxiliares de enfermagem, feridas cirúrgicas	ANDRADE et al. (2007)
<i>Staphylococcus coagulase (+)</i>	Mesa de procedimentos em setor de internação, Mesa de pré-operatório, mesa de atendimento clínico	AVANCINI e GONZÁLES (2014)
	Mesas ambulatoriais e de enfermagem, boxes de isolamento, mãos de médicos veterinários, enfermeiros e auxiliares de enfermagem, orofaringe de médicos veterinários, enfermeiros e auxiliares de enfermagem, feridas cirúrgicas	ANDRADE et al. (2007)
<i>Streptococcus</i> sp.	Sala cirúrgica, mesas cirúrgicas, mesas ambulatoriais e de enfermagem, boxes de isolamento, mãos de médicos veterinários, enfermeiros e auxiliares de enfermagem, orofaringe de médicos veterinários, enfermeiros e auxiliares de enfermagem, feridas cirúrgicas	ANDRADE et al. (2007)
	Mesa de atendimento clínico	AVANCINI e GONZÁLES (2014)
	Infecção incisional cirúrgica superficial, Infecção na corrente sanguínea	ARIAS et al. (2013)

Quadro 1, Cont.

<i>Escherichia coli</i>	Boxes de isolamento, mãos de médicos veterinários, enfermeiros e auxiliares de enfermagem, feridas cirúrgicas	ANDRADE et al. (2007)
	Ambiente hospitalar veterinário	SANTOS et al. (2010)
<i>Proteus sp.</i>	Boxes de isolamento, feridas cirúrgicas	ANDRADE et al. (2007)
<i>Enterobacter sp.</i>	Sala cirúrgica, mesas cirúrgicas, mesas ambulatoriais e de enfermagem, boxes de isolamento, mãos de médicos veterinários, enfermeiros e auxiliares de enfermagem, orofaringe de médicos veterinários, enfermeiros e auxiliares de enfermagem, feridas cirúrgicas	ANDRADE et al. (2007)
	Mesa de atendimento clínico	AVANCINI e GONZÁLES (2014)
<i>Enterobacter agglomerans</i>	Ambiente hospitalar veterinário	SANTOS et al. (2010)
<i>Pseudomonas sp.</i>	Mesa de atendimento clínico	AVANCINI e GONZÁLES (2014)
	mesas cirúrgicas, mesas ambulatoriais e de enfermagem, boxes de isolamento, mãos de médicos veterinários, enfermeiros e auxiliares de enfermagem, orofaringe de médicos veterinários, enfermeiros e auxiliares de enfermagem, feridas cirúrgicas	ANDRADE et al. (2007)
	Infecção incisional cirúrgica superficial, Infecção na corrente sanguínea	ARIAS et al. (2013)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ambiente hospitalar veterinário	SANTOS et al. (2010)
<i>Klebsiella sp.</i>	Orofaringe de médicos veterinários, enfermeiros e auxiliares de enfermagem, feridas cirúrgicas	ANDRADE et al. (2007)

Quadro 1, Cont.

	Mesa de procedimentos em setor de internação	AVANCINI e GONZÁLES (2014)
<i>Micrococcus sp.</i>	Mesas cirúrgicas, boxes de isolamento, mãos de médicos veterinários, enfermeiros e auxiliares de enfermagem, orofaringe de médicos veterinários, enfermeiros e auxiliares de enfermagem, feridas cirúrgicas	ANDRADE et al. (2007)
<i>Bacillus cereus</i>	Mesa de atendimento clínico	AVANCINI e GONZÁLES (2014)
<i>Bacillus sp.</i>	Mesa de procedimentos em setor de internação	AVANCINI e GONZÁLES (2014)
<i>Citrobacter sp.</i>	Mesa de procedimentos em setor de internação	AVANCINI e GONZÁLES (2014)
	Sala cirúrgica, mesas cirúrgicas, boxes de isolamento, feridas cirúrgicas	ANDRADE et al. (2007)
<i>Providencia sp.</i>	Boxes de isolamento	ANDRADE et al. (2007)
<i>Corynebacterium pyogenes</i>	Ambiente hospitalar veterinário	SANTOS et al. (2010)
<i>Enterococcus sp</i>	Mesa de fluidoterapia	AVANCINI e GONZÁLES (2014)
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Mesa de atendimento clínico	AVANCINI e GONZÁLES (2014)

Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

2.3 Resistência bacteriana a antimicrobianos

A capacidade de alguns microrganismos resistirem aos efeitos de antimicrobianos é um problema mundial e rotineiro em hospitais humanos e veterinários.

Segundo Fio e colaboradores (2000), a resistência aos antibióticos pode ser intrínseca (quando faz parte das características naturais e fenotípicas do microrganismo, sendo transmitida verticalmente, constando em suas características genéticas) ou adquirida (quando há o aparecimento de resistência em uma espécie bacteriana anteriormente sensível à droga em questão e essa

característica está ausente em suas células genitoras). A resistência adquirida é resultado de alterações estruturais e/ou bioquímicas na célula bacteriana determinada por alterações genéticas cromossômicas ou extracromossômicas (plasmídeos).

Vários mecanismos podem estar relacionados à resistência bacteriana, tais como: o resultado da destruição enzimática do antibiótico (por exemplo, a produção de β -lactamases por algumas bactérias que inibem a atuação de fármacos β -lactâmicos); alteração da permeabilidade bacteriana ao antibiótico (alguns *Streptococcus* possuem uma barreira natural contra os aminoglicosídeos, a qual pode ser superada se um fármaco ativo contra a parede celular for utilizado simultaneamente); alteração do alvo estrutural para o antibiótico (resistência para aminoglicosídeos pode se desenvolver por meio da alteração da composição proteica do ribossomo bacteriano que serve como receptor em microrganismos suscetíveis) ou pelo desenvolvimento de vias metabólicas alternativas que passam pela reação antagonizada pelo antibiótico em particular (Willard e Schulz, 2014).

O mecanismo de resistência de alguns microrganismos encontra-se descrito no Quadro 2.

Quadro 2. Mecanismos de resistência a antimicrobianos por bactérias.

Microrganismo	TR	CA	MR	Autor
<i>Staphylococcus aureus</i>	adquirida	β -lactâmicos	Produção de PBP (Penicillin-binding protein) – PBP2a pelo gen <i>MecA</i> , que é parte integrante do elemento genômico SCCmec (Staphylococcal chromosomal cassette) – reduz a afinidade pela penicilina e B-lactâmicos em geral. Presente em <i>S. aureus</i> MRSA.	Pantosti et al. (2007)
	adquirida	Glicopeptídeos (Vanvomicina)	Parede espessada rica em peptidoglicanos não reticulados na célula alvo e exibem o terminal dipeptídeo D-Ala D-Ala, alvo da vancomicina, gera a resistência intermediária a esse antimicrobiano.	Pantosti et al. (2007)
			Aquisição do aparato genético de resistência a glicopeptídeos de enterococcus (<i>VanA</i> operon), que codificam precursores de peptidoglicanos modificados (D-Ala D-Lac) e a eliminação dos alvos suscetíveis, gerando resistência à vancomicina.	Pantosti et al. (2007)
<i>Enterococcus sp.</i>	intrínseca	β -lactâmicos	Produção de PBP (Penicillin-binding protein) PBP5 - reduz a afinidade pela penicilina e B-lactâmicos em geral.	Cercenado (2011)

Quadro 2, Cont.

<i>Enterococcus</i> sp.	Intrínseca	Aminoglicosídeos	Produção de enzimas na parede celular que inativam aminoglicosídeos, podem ser fosfotransferases, acetil transferases e nucleotidiltransferases.	Cercenado (2011)
	Intrínseca	Glicopeptídeos	Aparato genético de resistência a glicopeptídeos (VanC operon), que codificam precursores de peptidoglicanos modificados (D-Ala D-Ser) e a eliminação dos alvos suscetíveis, gerando resistência à vancomicina	Cercenado (2011)
	Adquirida	Glicopeptídeos	Aparato genético de resistência a glicopeptídeos (VanE, VanG, VanL e VanN operon), que codificam precursores de peptidoglicanos modificados (D-Ala D-Ser) e (VanA, VanB, VanD e VanM operon), que codificam precursores de peptidoglicanos modificados (D-Ala D-Lac) a eliminação dos alvos suscetíveis, gerando resistência à vancomicina.	Cercenado (2011)
	Intrínseca	Macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas	Presença do gen erm(B) e, algumas vezes, o gen erm(A) que metila um resíduo de adenina na subunidade 23S do RNA ribossômico e reduz a união desses grupos de fármacos ao ribossomo.	Cercenado (2011)

Quadro 2, Cont.

<i>Enterococcus sp.</i>	adquirida	Macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas	Gen Inu(B) – produz nucleotidiltransferase que adenila um grupo hidroxila nesses antibióticos.	Cercenado (2011)
	adquirida	fluoroquinolonas	Mutação no gen parC que codifica a subunidade ParC da topoisomerase IV e mutação no gen gyrA que codifica a subunidade GyrA da DNA girase	Cercenado (2011)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	adquirida	β -lactâmicos	Produção de β -lactamases tipo AmpC por grupos de gens presentes no DNA ou plasmídeos. Produção de β -lactamases de grupo estendido (BLEE) mediada por plasmídeos.	Bertona et al. (2005)

Fonte: Elaborado pelo autor (2021). Legenda TR (Tipo de Resistência), CA (Classe antimicrobiana), MR (Mecanismo de resistência).

Segundo Tavares (2014), a importância das substâncias antimicrobianas no aumento do fenômeno da resistência reside no seu papel selecionador dos exemplares resistentes por meio da pressão seletiva resultante de seu emprego clínico (humano e veterinário), industrial (conservação de alimentos), comercial (engorda de animais, tratamento de vegetais) e experimental. Para o autor, o problema é, sobretudo, observado no ambiente hospitalar, onde a pressão do uso dessas drogas é maior.

No ambiente hospitalar, humano e veterinário, a identificação de bactérias resistentes a antimicrobianos tem sido foco de pesquisa de diversos autores (Quadro 3) e os testes de susceptibilidade aos antibióticos (TSA) são uma ferramenta essencial para diagnóstico e tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes aos antimicrobianos. Os testes podem ser classificados como qualitativos ou quantitativos. O teste de difusão em disco é um dos testes

qualitativos mais difundidos, pela facilidade e padronização de realização, baixo custo, necessidade de poucos equipamentos específicos e facilidade de interpretação dos seus resultados por clínicos. Entre os testes quantitativos, destaca-se a concentração mínima inibitória de antimicrobianos, no qual o microrganismo é submetido a diluições seriadas de antimicrobiano até determinar a menor diluição que produzirá halo inibitório. Como principais vantagens dessa técnica destacam-se a possibilidade de resultado quantitativo e a avaliação de um número substancial de bactérias presentes no inóculo inicial.

Quadro 3. Microrganismos isolados em hospitais veterinários e resistência a antimicrobianos.

Microrganismo	Antibiótico que desenvolveu resistência	Autores
<i>Staphylococcus aureus</i>	Penicilina G 10 UI, Vancomicina 30 µg, Clindamicina 2 µg, Oxacilina 1µg, Sulfametoxazol + trimetoprim 25 µg, Cloranfenicol 30 µg, Cefoxitima 30 µg, Rifamicina B.	SANTOS et al. (2010)
	Penicilina, Oxacilina, Cefoxima, Gentamicina, Amicacina	BAZÍLIO et al. (2016)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Eritromicina 15 µg, Clindamicina 2 µg, Sulfametoxazol + trimetoprim 25 µg,	SANTOS et al. (2010)
<i>Streptococcus sp.</i>	Amicacina, Gentamicina, Cefalexina, Enrofloxacina, Ciprofloxacina, Norfloxacina, Sulfazotrim	ARIAS et al. (2013)
<i>Escherichia coli</i>	Penicilina G 10 UI, Vancomicina 30 µg, Eritromicina 15 µg, Clindamicina 2 µg, Oxacilina 1µg, Sulfametoxazol + trimetoprim 25 µg, Gentamicina 10 µg, Cefoxitima 30 µg, Rifamicina B.	SANTOS et al. (2010)
<i>Enterobacter agglomerans</i>	Cefoxitima 30 µg, Rifamicina B.	SANTOS et al. (2010)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Penicilina G 10 UI, Vancomicina 30 µg, Clindamicina 2 µg, Oxacilina 1µg, Sulfametoxazol + trimetoprim 25 µg, Ciprofloxacina 5 µg, Cloranfenicol 30 µg, Gentamicina 10 µg, Cefoxitima 30 µg, Rifamicina B.	SANTOS et al. (2010)

Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

2.4 *Bacillus* sp. SMIA-2

As bactérias do gênero *Bacillus* encontram-se normalmente no solo, são tipicamente bastonetes que produzem endósporos e somente algumas espécies são patogênicas para humanos (TORTORA et al., 2005).

Muitos bacilos produzem enzimas hidrolíticas extracelulares que degradam polímeros complexos, como polissacarídeos, ácidos nucleicos e lipídios, permitindo aos organismos utilizar esses produtos como fontes de carbono e doadores de elétrons. Além disso, vários bacilos produzem antibióticos como, por exemplo, a bacitracina, polimixina, tirocidina, gramicidina e circulina (MADIGAN et al., 2010). Diversas espécies de *Bacillus* isoladas têm demonstrado ação antimicrobiana por meio da inibição do crescimento de bactérias e fungos e os resultados encontrados pelos autores estão demonstrados no Quadro 4.

Quadro 4. Ação antimicrobiana de cepas de *Bacillus* sp. sobre microrganismos.

Cepa de <i>Bacillus</i> sp. isolada	Microrganismos inibidos	Autores
<i>Bacillus</i> sp. FAS ₁	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Salmonella</i> <i>Tuphi</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus niger</i>	MOSHAFI et al. (2011)
<i>Bacillus</i> sp.	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> <i>Tuphi</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	AMIN et al. (2015)
<i>Bacillus</i> sp. 7B1	<i>Micrococcus luteus</i> <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	AL-SARAIREH et al. (2015)
<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Escherichia coli</i>	CHU et al. (2019)
<i>Bacillus subtilis</i> KATMIRA 1933 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> B-1895	<i>Staphylococcus aureus</i>	ALGBURI et al. (2020)

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Bacillus sp. SMIA-2, a bactéria que foi utilizada neste trabalho (Figura 2), foi isolada de amostras de solo coletadas na cidade de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. A análise filogenética mostrou que a cepa é um membro do grupo 5 que inclui *Bacillus stearothermophilus* e outros *Bacillus* spp. termofílicos (Nunes e Martins, 2001).

Recentemente, Bernardo et al. (2020) ressequenciaram o gene 16S rRNA e posteriormente o genoma completo do SMIA-2, visando à identificação da sua espécie e de possíveis genes relacionados com a biossíntese de metabólitos secundários. O ressequenciamento do gene 16S rRNA do SMIA-2, mostrou que essa bactéria é 100% idêntica à cepa *Bacillus licheniformis* Gibson 46T. A análise do seu genoma mostrou que ele codifica inventários de genes que suportam a produção de enzimas, incluindo 6 genes para amilase, 13 loci para o metabolismo da xilose, 55 loci associados à degradação de proteínas, 3 loci de enzimas celulolíticas, sob um suposto complexo de celulosoma e 5 grupos de genes envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas (Lichenysin, Fengycin, Bacillibactin).

Bactérias do gênero *Bacillus* estão entre os principais microrganismos produtores de enzimas de interesse industrial. Essas bactérias são capazes de utilizar substâncias orgânicas consistindo de misturas complexas típicas de resíduos. Conseqüentemente, são notáveis produtoras de uma ampla gama de enzimas hidrolíticas extracelulares de grande interesse comercial (Ladeira et al., 2015). Além disso, apresentam espécies termófilas capazes de fermentar em uma ampla variedade de valores de temperatura e pH e originar produtos estáveis em uma ampla faixa de ambientes adversos (Barbosa et al., 2014).

O *Bacillus* sp. SMIA-2 revelou-se excelente produtor de várias enzimas hidrolíticas, incluindo proteases (Ladeira et al., 2010; Barbosa et al., 2014), amilases (Correa et al., 2011) e celulasas (Ladeira et al., 2015, Costa et al., 2017), quando cultivado em culturas submersas contendo resíduos agroindustriais como substratos de baixo custo, abrindo novas perspectivas para utilização desta cepa para a produção de enzimas em escala industrial. A boa atividade apresentada pelas enzimas produzidas pelo SMIA-2 em uma ampla faixa de valores de pH, boa estabilidade e atividade a temperaturas relativamente elevadas (Ladeira et al., 2015, Ferreira, 2018), indicou a possibilidade de aplicação das enzimas em formulações de limpeza biodegradáveis. Essas

características são extremamente relevantes para sua utilização como um detergente para a remoção de biofilmes bacterianos.

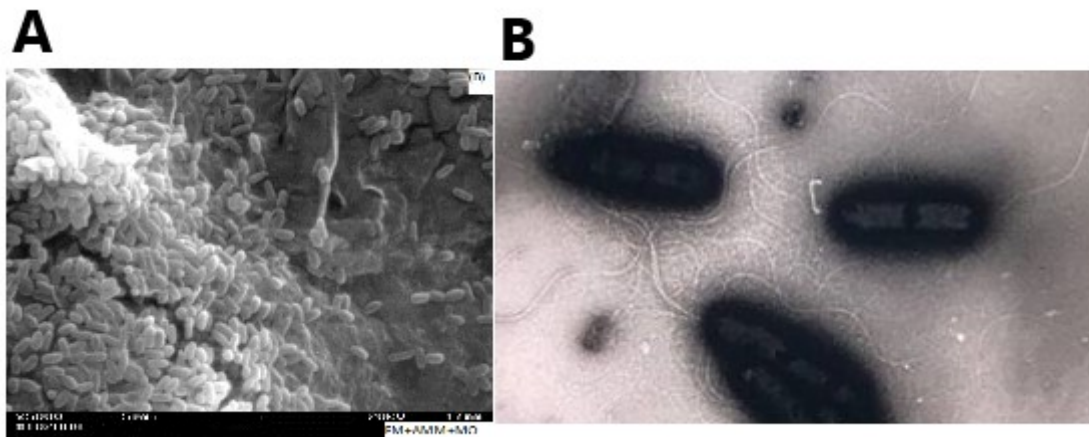


Figura 1. A. Células de *Bacillus* sp. SMIA-2 em culturas submersas contendo farinha da casca de maracujá, água de maceração de milho e minerais após 72 h de incubação a 50°C (Cruz, 2017). B. Micrografia Eletrônica de Transmissão (TEM) mostrando célula flagelada e endósporo elipsoidal (Bernardo et al., 2020).

2.5 Biofilmes bacterianos

Biofilmes podem ser definidos como comunidades microbianas aderidas a uma superfície e envolvidas por uma matriz extracelular (Boles e Horswill, 2011). Diversos microrganismos podem formar os biofilmes, causando grande impacto na indústria médica e de alimentos. Entretanto, o maior número de estudos refere-se à colonização de superfícies por bactérias (Lindsay e Holy, 2006). Entre essas bactérias, diversos estudos direcionam-se para a formação de biofilmes formados por bactérias com potencial patogênico, como o *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Listeria Monocytogenes*, *Streptococcus mutans*, *Salmonella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, entre outros (Pan et al, 2006; Trentin et al, 2013; Lister e Horswill, 2014). Esses microrganismos podem formar biofilmes em diversas superfícies tanto bióticas (como intestino e dentes) e abióticas (aço inoxidável, polipropileno, entre outras) (Lindsay e Holy, 2006; Santos Junior, 2014).

De modo geral, a formação do biofilme pode ser dividida em pelo menos três eventos principais: a adesão inicial, a maturação do biofilme e a dispersão (Figura 1). Na fase de adesão ou ligação inicial, uma célula planctônica se adere reversivelmente a uma superfície e, se não se dissociar, adere-se de forma irreversível. Esse evento é mediado por componentes da superfície microbiana, principalmente proteínas, que reconhecem a matriz adesiva. (FOSTER et al., 2014). Segundo Lister e Horswill (2014), a maturação ocorre por meio da divisão celular e produção da matriz polimérica extracelular, cuja composição varia de acordo com as cepas bacterianas, mas geralmente contém substâncias do hospedeiro, polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular (eDNA). Em estudos *in vitro*, biofilmes formados por *Staphylococcus* precisam de adição de componentes ao meio para crescimento, e a glicose normalmente é o suplemento de escolha, promovendo acidificação inicial do meio causado pelo aumento da excreção de metabólitos secundários (Kiedrowski e Horswill, 2011).

A matriz dos biofilmes é formada principalmente por polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular e promove proteção contra uma grande variedade de fatores, com ataque do sistema imunológico e exposição a antimicrobianos.

Como as proteínas são o segundo principal componente dos biofilmes de *Staphylococcus*, a sua dispersão pode ocorrer em razão da ação de algumas proteases (Boles e Horswill, 2011). Segundo os mesmos autores, o processo primário de dispersão utilizado pelo *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* está relacionado com a produção de enzimas e surfactantes que degradam e solubilizam a matriz extracelular, resultando no destacamento de células da colônia e sua liberação no ambiente. BOLES e HORSWILL (2008) relatam que, entre outros fatores, as proteases extracelulares têm sido relacionadas ao processo de dispersão e que a utilização de inibidores de proteases promove a formação do biofilme, mesmo sob condições ambientais que acelerariam a dispersão. Isso confirma que há uma correlação inversa entre a expressão de protease e a formação do biofilme.

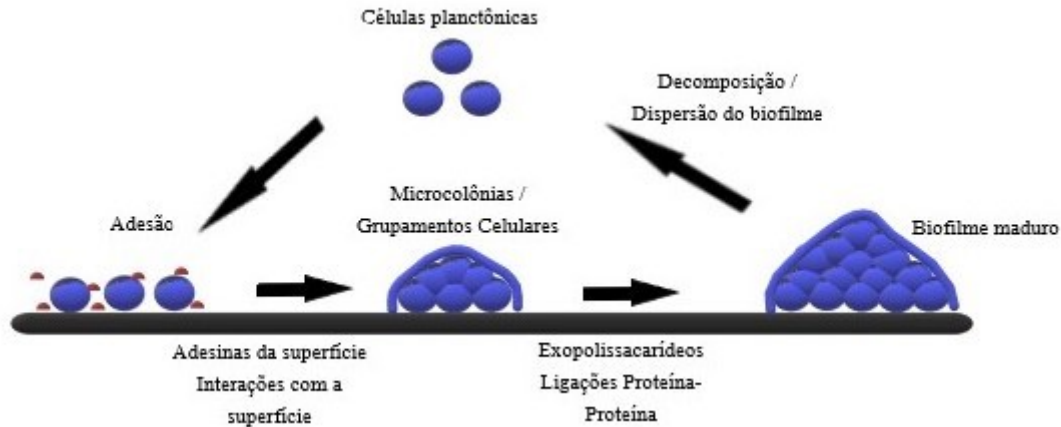


Figura 2. Etapas da formação dos biofilmes.

Fonte: Baseado no esquema de Kiedrowski e Horswill (2011).

2.6 Detergentes enzimáticos no reprocessamento de produtos para a saúde

Muitos produtos utilizados em unidades de saúde são produzidos com materiais que permitem procedimentos de limpeza e tratamentos para desinfecção ou esterilização repetidas. Segundo a RDC n. 15 de 15 de março de 2012 (BRASIL, 2012), o reprocessamento desses produtos é o conjunto de ações relacionadas a pré-limpeza, recepção, limpeza, secagem, avaliação da integridade e funcionalidade, preparo, desinfecção ou esterilização, armazenamento e distribuição para unidades consumidoras. Segundo a mesma norma, a pré-limpeza é definida como a remoção da sujidade visível nos produtos para saúde e a limpeza refere-se a remoção de sujidades orgânicas e inorgânicas, redução da carga microbiana presente nos produtos para saúde, utilizando água, detergentes, produtos e acessórios de limpeza, por meio de ação mecânica (manual ou automatizada), atuando em superfícies internas (lúmen) e externas, a fim de tornar o produto seguro para manuseio e preparado para desinfecção ou esterilização.

Os detergentes destacam-se entre os produtos mais utilizados para limpeza desses produtos, e alguns desses, possuem enzimas em sua composição que favorecem a remoção da matéria orgânica. No Brasil, a RDC n. 55 de 14 de novembro de 2012 (BRASIL, 2012) dispõe sobre a utilização de detergentes enzimáticos para uso restrito em estabelecimentos de assistência à saúde com indicação de limpeza de equipamentos médicos, definindo-os como:

produto cuja formulação contém, além de um tensoativo, pelo menos uma enzima hidrolítica da subclasse das proteases EC 3.4, podendo ser acrescida de outra enzima da subclasse das amilases EC 3.2 e demais componentes complementares da formulação, inclusive de enzimas de outras subclasses, tendo como finalidade remover a sujidade clínica e evitar a formação de compostos insolúveis na superfície desses dispositivos. Segundo o mesmo regulamento, os detergentes enzimáticos são considerados de Risco 2 (médio risco) e estão sujeitos ao registro da Anvisa.

Para limpeza de instrumentais, uma solução com detergente neutro ou próximo do neutro é comumente utilizada, pois possuem compatibilidade com o material e com a remoção de sujidades. Enzimas, normalmente proteases, podem ser adicionadas a essas soluções como forma de auxiliar na remoção de matéria orgânica, visto que degradam uma grande parte das sujeiras comuns, por exemplo o sangue e o pus (Rutala et al., 2008). Maurer (2004) relata que a ideia de utilização de proteases na indústria, e especificamente em detergentes, começou com o uso de extratos pancreáticos por Roehm em 1913 e apenas com a disponibilização de enzimas produzidas por bactérias na década de 60, surgiram técnicas comerciais eficientes utilizando inicialmente enzimas produzidas pelos *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus licheniformis*.

Em uma revisão detalhada sobre detergentes enzimáticos no reprocessamento de produtos para a saúde, Centurión et al. (2019) relatam que 71% dos artigos consultados enfatizam a eficácia dos detergentes enzimáticos na remoção da carga microbiana e/ou biofilme e outras sujidades, recomendando-os para o reprocessamento de produtos para a saúde. Stiefel et al. (2016), ao realizar um estudo para limpeza de endoscópios, concluíram que a adição de enzimas, principalmente as proteases, na formulação base do detergente melhora a ação deste, promovendo uma remoção eficiente do biofilme de *Staphylococcus aureus*. Trabalhos utilizando outros biocidas comuns reforçam a importância de produtos eficientes na remoção do biofilme e na prevenção da contaminação do ambiente hospitalar. Ao avaliar a eficácia do cloreto de benzalcônio, clorexidina e triclosan em concentrações recomendadas pelo fabricante, Smith e Hunter (2008) relataram que nenhum deles matou 100% das células em biofilmes formados por *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes a antibióticos.

3. TRABALHOS

3.1 Antimicrobial effect of the *Bacillus* sp. SMIA-2 and conventional antibiotics on bacteria isolated of a veterinary surgical center¹

Efeito antimicrobiano do *Bacillus* sp. SMIA-2 e antibióticos convencionais sobre bactérias isoladas em centro cirúrgico veterinário

¹ Parte da tese de doutorado que será submetida em formato de artigo na Revista Ciência Rural.

ABSTRACT

Multidrug-resistant bacterial infections are causes of mortality in patients in human and veterinary medicine. The identification of these microorganisms in hospital environments and the search for new effective drugs should be a constant concern. Several bacteria of the genus *Bacillus* sp. have the ability to produce antimicrobial substances. The objective of this study was to isolate bacteria present in a veterinary surgical center and to evaluate the antimicrobial activity of commercial antibiotics and *Bacillus licheniformis* SMIA-2 on these bacteria. The isolate bacteria were: *Bacillus* gram-positive sp., *Enterococcus* sp., *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. With the exception of *Staphylococcus epidermidis*, at least one of the samples of the isolated bacteria showed antimicrobial resistance to commercial antibiotics. *Bacillus* sp. SMIA-2 showed activity against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Further studies are recommended for the isolation and identification of substances with antibiotic potential produced by this specie of *bacillus*.

Keywords: antimicrobials, bacterial resistance, microorganisms, infection.

RESUMO

Infecções provocadas por bactérias multirresistentes são causas de mortalidade em pacientes da medicina humana e veterinária. A identificação desses microrganismos em ambientes hospitalares e a busca por novos medicamentos eficazes devem ser uma preocupação constante. Diversas bactérias do gênero *Bacillus* sp. possuem a capacidade de produzir substâncias antimicrobianas. O objetivo desse trabalho foi isolar bactérias presentes em um centro cirúrgico veterinário e avaliar a atividade antimicrobiana de *Bacillus* sp. SMIA-2 e antibióticos comerciais sobre essas bactérias. As bactérias isoladas foram: *Bacillus gram-positivo* sp., *Enterococcus* sp., *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Com exceção do *Staphylococcus epidermidis*, pelo menos uma das amostras das bactérias isoladas apresentou resistência antimicrobiana aos antibióticos comerciais. O *Bacillus* sp. SMIA-2 apresentou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Recomendam-se novos estudos para isolamento e identificação das substâncias com potencial antibiótico produzidas por essa espécie de *Bacillus*.

Palavras-chave: antimicrobianos, resistência bacteriana, microrganismos, infecção.

INTRODUCTION

Infections acquired in both human and animal hospitals represent one of the causes of death in hospitalized patients and thus is a worldwide problem (BRASIL, 2017). As the infections acquired in the hospital may be drug resistant and are often transmissible between humans and nonhuman animals they represent a risk for patients, owners, and hospital staff (WILLARD & SCULZ, 2014). Several microorganisms are responsible for hospital infections and it is well known that surfaces act as reservoirs for these microorganisms (ANDRADE et al., 2007; SANTOS et al., 2007; GARRETT et al., 2008; FERREIRA et al., 2011; AVANCINI & GONZÁLES, 2014; BAZÍLIO et al., 2016) and could contribute to the transmission of hospital pathogens, increasing the risk of cross-contamination through indirect contact with the patient. To reduce these risks, there is an urgent need for sustainable and effective alternatives to new cleaning and disinfecting chemicals to sanitize environments and surfaces and thus to control the load of pathogenic bacteria (VANDINI et al., 2014). The development of detergents containing spores of *Bacillus* probiotics is an alternative pointed out by many researchers as effective to control contamination by pathogens on hospital surfaces and consequently promote the reduction of antimicrobial resistance species (CASELLI et al., 2016). The ability of these organisms to produce acids and/or bacteriocins and other secondary metabolites have a favorable impact on their competitiveness against other microbes (NWAGU et al., 2020).

Currently, the availability of whole genome sequencing and readily available bioinformatics tools have become a powerful approach for identification of gene clusters associated with the synthesis of substances useful for biotechnology (CHAVALI & RHEE, 2018; WEBER & KIM, 2016) such as antimicrobial compounds. In this context, recently, BERNARDO et al. (2020) sequenced the entire genome of *Bacillus* sp. SMIA-2 and

reported that it harbors genes that encode non-ribosomal peptides involved in the biosynthesis of the secondary metabolite. The SMIA-2 strain is a Gram-positive, strictly aerobic, thermophilic and spore-forming bacterium that was isolated in 2001 from soil in Campos dos Goytacazes city, Rio de Janeiro, Brazil. The SMIA-2 strain produces industrially relevant thermostable enzymes such as proteases (SILVA et al., 2007), amylases (CARVALHO et al., 2008a; 2008b), pectinases (ANDRADE et al., 2011) and cellulases (OLIVEIRA et al., 2014; LADEIRA et al., 2015; COSTA et al., 2017; CRUZ et al., 2019) employing diverse agricultural byproducts as fermentation substrates.

In this study the antagonistic effect of *Bacillus* sp. SMIA-2 against bacteria isolated from a veterinary surgical center was measured in terms of zone of inhibition and the results compared with antibiotics of current use.

MATERIAL AND METHODS

Strains

The bacterial strain investigated for antimicrobial activity in this study is a thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2, previously isolated from a soil sample collected in Campos dos Goytacazes city, Rio de Janeiro, Brazil (SOUZA & MARTINS, 2001). The strain was phylogenetically categorized in thermophilic *Bacillus* group 5, with 94% similarity to *Bacillus caldoolyolyticus* (GenBank accession number AH010483.2). The resequencing of the 16S rRNA gene (GenBank accession number MN645931) revealed that SMIA-2 is 100% identical to the type strain *Bacillus licheniformis* Gibson 46 (BERNARDO et al., 2020).

The different strains used for antimicrobial susceptibility were isolated from a surgical room at the veterinary clinic of the Federal Institute of Espírito Santo – Campus of Alegre, ES.

Isolation and identification of the bacteria

The samples were collected across the surface of the surgical table, divided into 10 parts, immediately after performing an elective surgical procedure in a patient who did not show any sign of infectious disease.

Sample collection was performed using 10 sterile swabs moistened with normal saline, according to standard operating procedures. The swab samples were placed tightly in well labeled swab caps and transported immediately to the Laboratory of Diagnostics and Management in Health LTDA-ME located in the city of Alegre-ES and cultured.

Upon arrival at the laboratory, the swabs were inoculate onto Brain Heart Infusion Broth (BHI) and incubated at 37 °C for 24 hours and inspected for bacterial growth. Thereafter, the cultures were seeded in Petri dishes containing blood agar and then incubated at 37 °C for 24 hours. The isolates colonies were purified using the exhaustion by streak technique in blood agar medium and their purity was confirmed with Gram stain, hemolysis patterns and colonial characteristics.

Antibiotic Susceptibility tests

Disc diffusion method was used to assess the antibiotic susceptibility patterns of the isolates to a panel of selected antibiotics following guidelines prescribed by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2019). The isolates obtained were tested against the following conventional antibiotics: AMI (amikacin 30 µg), AMC (amoxicillin + potassium clavulanate 20 µg/10 µg), AZI (azithromycin 15 µg), CFE (cephalexin 30 µg), CFL (cephalothin 30 µg), CRO (ceftriaxone 30 µg), CIP (ciprofloxacin 5 µg), CLO

(chloramphenicol 20 µg), DOX (doxycycline 30 µg), GEN (gentamicin 10 µg), SUT (sulfamethoxazole + trimethoprim 23.75/1.25 µg). The plates were stored at 37 °C for 24 hours and then inhibitory halos were measured using a digital pachymeter (Model 316119, MTX) and expressed in millimeters (mm). The presence of inhibition of halos was recorded as an activity antimicrobial of the tested isolated. Each bacteria isolated was classified as susceptible (S), intermediate (I), resistant (R) or intrinsic resistance of the microorganism to the antibiotic tested (R*) (Table 1) according to the zone of inhibition diameters following the parameters determined by the manufacture's manual -Laborclin, Brazil (LABORCLIN, 2019).

Table 1. Detection of Susceptibility of isoloed pathogenic bacteria to the tested antibiotics.

(in accordance to National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI 2019).

Antibiotic	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Enterococcus sp.</i> <i>Staphylococcus sp.</i>								
	Inhibition halo (mm)								
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
AMI 30 µg	≤14	15-16	≥17	R*	R*	R*	≤14	15-16	≥17
AMC 20 µg / 10 µg	≤13	14-17	≥18	R*	R*	R*	≤28	-	≥29
AZI 15 µg	R*	R*	R*	R*	R*	R*	≤13	14-17	≥18
CFE 30 µg	≤14	15-17	≥18	R*	R*	R*	≤14	15-17	≥18
CFL 30 µg	≤14	15-17	≥18	R*	R*	R*	≤14	15-17	≥18
CRO 30 µg	≤19	20-22	≥23	R*	R*	R*	≤13	14-20	≥21
CIP 5 µg	≤13	14-16	≥17	≤15	16-20	≥21	≤15	16-20	≥21
CLO20 µg	≤12	13-17	≥18	≤12	13-17	≥18	≤12	13-17	≥18
DOX 30 µg	≤10	11-13	≥14	≤12	12-15	≥16	≤12	13-15	≥16
GEN 10 µg	≤12	13-14	≥15	R*	R*	R*	≤12	13-14	≥15
SUT 23 µg /1,25 µg	≤10	11-15	≥16	R*	R*	R*	≤10	11-15	≥16

Source: Chart supplied by antibiotic discs manufactures - laborclin, Brazil (LABORCLIN, 2019).

Bacillus sp. SMIA-2 susceptibility tests

For screening of antimicrobial activity of the SMIA-2 strain, the overlay assay was performed in triplicate (BENITEZ et al., 2011; COVENTRY et al., 1996). An 18-h culture was placed into plates with Brain Heart Infusion (BHI) (Oxoid, England) agar with

a sterilized metal needle and incubated at 50°C for 12-h in aerobic conditions. After incubation, a layer of 8 ml of soft BHI agar (0.8% w/v agar) containing a suspension with 1.5×10^8 colony forming units per ml (0.5 McFarland unit) of each isolated microorganism was poured over the plates. After incubation under appropriate conditions for each microorganism, growth inhibition was detected by the appearance of a clear zone around the producer strain, which was measured using a digital caliper. The plates without the SMIA-2 strain were also inoculated and tested as controls. As the growth of the colonies was irregular, the comparison between the size of the halo formed by SMIA-2 with each of the commercial antibiotics, was made by adjusting the measurement of the halo formed by the antibiotic as follows: inhibitory halo - 6.5 mm) / 2, where 6.5 mm is the standard diameter of the commercial disk containing the antibiotic.

Statistical analysis

The data obtained were statistically evaluated using the Tukey test at 1% significance using the SAEG program - System for Statistical Analysis, version 9.1.

RESULTS

Isolation and identification of the bacteria

The presence of microorganisms was evidenced on the surfaces of the surgical table of the veterinary clinic. Eleven bacteria were isolated from the ten samples collected, six of which, were identified as *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* and five as belonging to the genus *Enterococcus* sp. and *Bacillus*

gram-positive sp. With the exception of Gram-positive bacilli present in three samples, all other bacteria are of clinical veterinary importance.

Antibiotic Susceptibility of the isolates

The reference value of the inhibition zone to define the susceptibility of each isolated bacterium to the tested antibiotics was variable. The parameters used were defined by the antibiotic manufacturer's manual (LABORCLIN, 2019).

The antibiotic susceptibility of the isolates is showed in Figure 1. The *Enterococcus sp* was resistant to most tested antibiotics, mainly for presenting intrinsic resistance to some tested antibiotics, even with *in vitro* results (LABORCLIN, 2019), while the *Staphylococcus epidermidis* isolates were sensitive to all antibiotics tested. Regarding to *Staphylococcus aureus*, the isolates from three samples (1, 5 and 7) were sensitive to most antibiotics tested.

Figure 1. Antibiotic profiles of the microorganisms isolated from the veterinary clinic.

Bacteria	Antibiogram Results										
	AMI	AMC	AZI	CFE	CFL	CRO	CIP	CLO	DOX	GEN	SUT
<i>Enterobacter aerogenes</i> (2)	S	S	R*	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Enterococcus sp</i> (3)	R*	R*	R*	R*	R*	R*	S	S	S	R*	R*
<i>Enterococcus sp.</i> (9)	R*	R*	R*	R*	R*	R*	I	S	S	R*	R*
<i>S. aureus</i> (1)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>S. aureus</i> (5)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
<i>S. aureus</i> (7)	S	R	I	R	R	S	S	S	I	S	S
<i>S. epidermidis</i> (2)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>S. epidermidis</i> (6)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

The isolates were classified as susceptible (S), resistance (R), intrinsic resistance (R*) or indeterminate (I) according to the zone of inhibition diameters referenced by table 1.

The measurements of the inhibition halo by commercial antibiotics tested against *Staphylococcus* isolates are showed in Figure 2. The highest inhibition zones (mm) against *S. epidermidis* isolates were found with the CFL and CFE antibiotics, while the lowest inhibition zones (mm) were obtained with the antibiotic SUT. Regarding the three strains

of *S. aureus*, it was observed that the isolates from samples 1 and 5 showed different responses to the antibiotics tested from that observed for the isolate from sample 7. Overall, the *Staphylococcus* isolated from sample 7 showed lower inhibition zones than the other two isolates (sample 1 and 5).

Figure 2. Means of the halo of inhibition shown by the commercial antibiotics and overlay assay of SMIA-2 against *Staphylococcus* isolates.

<i>Staphylococcus aureus</i> (Sa1)												
Trat.	CFL	CFE	CIP	CRO	DOX	AMC	AZI	CLO	GEN	AMI	SUT	SMIA
Médias	14,75 ^a	14,92 ^{ab}	13,92 ^{bc}	13,75 ^{bc}	13,75 ^{bc}	12,75 ^{bcd}	12,75 ^{bcd}	11,42 ^{cd}	11,42 ^{cd}	10,42 ^d	10,08 ^d	2,49 ^e
<i>Staphylococcus aureus</i> (Sa5)												
Trat.	AMC	CRO	CFL	CFE	CLO	DOX	CIP	GEN	AZI	AMI	SMIA	SUT
Médias	13,58 ^a	13,25 ^a	13,08 ^a	12,08 ^a	11,92 ^a	11,75 ^a	11,42 ^a	11,42 ^a	11,08 ^a	10,25 ^a	5,66 ^b	4,25 ^b
<i>Staphylococcus aureus</i> (Sa7)												
Trat.	CRO	CIP	GEN	AMI	CLO	SUT	SMIA	DOX	AMC	AZI	CFE	CFL
Médias	11,75 ^a	11,25 ^a	8,42 ^b	7,59 ^{bc}	7,58 ^{bc}	6,41 ^{cd}	5,31 ^{de}	4,58 ^e	4,42 ^e	4,08 ^e	0,00 ^f	0,00 ^f
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (Sa2)												
Trat.	AMC	CFE	CFL	CIP	DOX	CRO	CLO	AMI	AZI	GEN	SUT	SMIA
Médias	22,08 ^a	17,75 ^b	17,75 ^b	13,08 ^c	12,42 ^c	12,25 ^c	11,42 ^c	11,25 ^c	10,75 ^c	10,75 ^c	6,75 ^d	2,71 ^e
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (Sa6)												
Trat.	AMC	CFL	CFE	DOX	AZI	CIP	CLO	GEN	AMI	CRO	SUT	SMIA
Médias	21,75 ^a	17,08 ^b	16,75 ^b	14,25 ^c	12,75 ^{cd}	12,75 ^{cd}	11,25 ^{de}	10,75 ^e	10,42 ^{ef}	9,75 ^{ef}	8,75 ^f	4,32 ^e

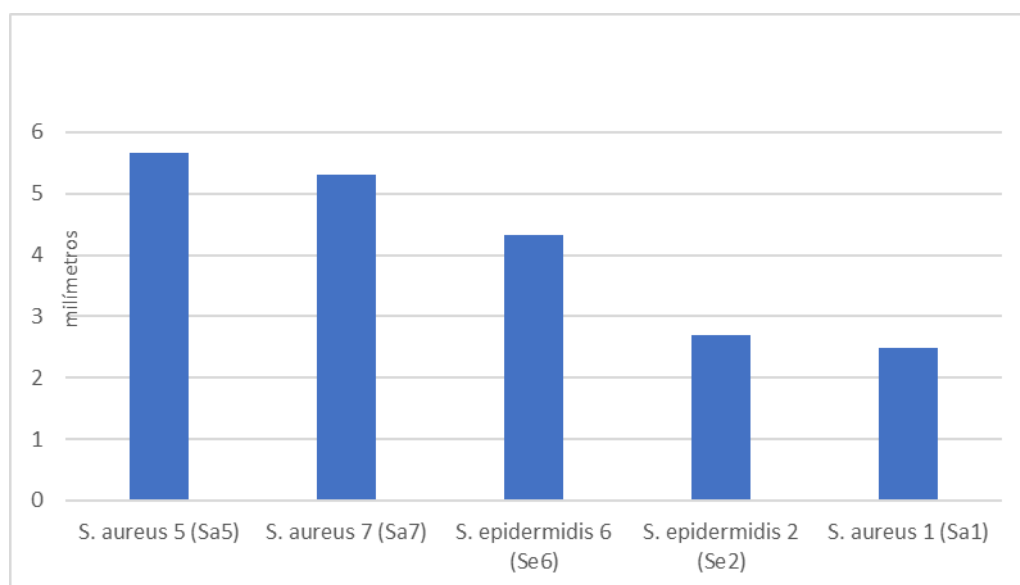
The means with different letters for the same strain of bacteria differ statistically by the Tukey test at 1% significance.

Bacillus SMIA-2 susceptibility tests

In the inhibition test using the SMIA-2 strain, no inhibitory halo was observed for the bacteria *Enterobacter aerogenes* and *Enterococcus* sp. However, all *Staphylococcus* sp. presented some inhibitory halo in the presence of SMIA-2 cells (Figure 3). It was found that in two samples of *Staphylococcus aureus* (5 and 7) the size of the halos was equal to or greater than those found for the tested antibiotics. For *Staphylococcus aureus* from sample 7, the inhibitory halo due to SMIA-2 cells was superior to the halos formed by the antibiotics cephalixin and cephalothin and similar to those formed by azithromycin, amoxicillin + potassium clavulanate, doxycycline and sulfamethoxazole + trimethoprim (Figure 2). When comparing the size of the halo of inhibition formed by the *Bacillus* sp. SMIA-2 antimicrobial test between bacteria isolated from the genus *Staphylococcus* sp., no

significant difference was observed only between the isolates *S. aureus* 5 and *S. aureus* 7 (Figure 3).

Figure 3. Means of the halo of inhibition formed by the *Bacillus* sp. SMIA-2 antimicrobial test against *Staphylococcus* isolates. Averages followed by different letters differ by the Tukey test at 1% significance.



DISCUSSION

Despite adopting all the recommended or necessary protocols to reduce the risk of infection in the surgical center of the veterinary clinic, the presence of bacteria of clinical veterinary importance was observed on the operating table such as *Enterococcus* sp., *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*.

Based on outbreaks reported in the literature to veterinary hospitals these bacteria are present in working environment surfaces and are identified as resistant to multiple

drugs and important organisms responsible for nosocomial infections (ANDRADE et al., 2007; SANTOS et al., 2010; AVANCINI & GONZÁLES, 2014; BAZÍLIO et al., 2016).

According to CASELLI et al. (2016), routinely used chemical disinfectants show limitations in controlling pathogen contamination, due to their inefficacy in preventing recontamination and selection of resistant strains. *S. epidermidis* and *S. aureus* are current examples of multidrug-resistant organisms involved in hospital-associated infections (BOERLIN et al., 2001; MALIK et al, 2005; STULL & WEESE, 2015). Both bacteria are often carried on the skin and mucous surfaces of dogs (*S. epidermidis*) and people (*S. aureus*).

The *S. epidermidis* isolates were sensitive to all antibiotic tested. SCHERER et al. (2018) identified and evaluated the antimicrobial susceptibility of *S. epidermidis* strains isolated from dogs with otitis. According to them, seventy-five percent of the strains were susceptible to cephalexin and 93.2% to amoxicillin plus clavulanic acid and less than 23% of the strains were susceptible to penicillin. On the other hand, for non-beta-lactam antimicrobials, 63.6% of the strains showed resistance to sulfamethoxazole-trimethoprim, 61.4% to tetracycline, and 38, 64% to enrofloxacin. In addition, 46.4% of *S. pseudintermedius* strains isolated from dogs were susceptible to all drugs tested, 39.9% were resistance to penicillin and 23.5% resistance to tetracycline (RUBIN & CHIRINO-TREJO, 2011).

Regarding to *S. aureus*, it was found that the isolated from the sample 5 was sensitive to all antibiotic tested and the isolates from the sample 5 and 7 were resistance to SUT, AMI and CFL, respectively. The clinical prevalence and antimicrobial susceptibility of *S. aureus* and *S. intermedius* in dogs was investigated by HOEKSTRA & PAULTON (2002). Antimicrobial resistance was commonly found for penicillin G, lincomycin, tetracycline and trimethoprim sulphamethoxazole in both *Staphylococcus* species. Several published works investigated the antimicrobial susceptibilities in *S. aureus* and *S.*

intermedius and the results often differed with regard to the local of isolation, sex and age of the animal.

The prevalence and diversity of veterinary clinical isolates of *Staphylococcus* and their antimicrobial susceptibility were reported by GODOY et al. (2016). The most common species was *S. pseudintermedius* (61%, 61/100) and resistance to erythromycin (57%, 57/100), trimethoprim-sulfamethoxazole (50%, 50/100) and amoxicillin (46%, 46/100) was detected most frequently. In total, 40% (40/100) of *Staphylococcus* spp. exhibited a multidrug-resistant (MDR) phenotype.

AMC was the most effective antibiotic (largest inhibition zone) against both isolates of *S. epidermidis* (Samples 2 and 6), while the SUT was the least effective (smaller zones of inhibition). For *Staphylococcus* there was no statistical difference in inhibition zone for the antibiotics CFL, CFE and CRO, CIP against the isolate from sample 1 and 7, respectively. In addition, for most of the antibiotics tested, the smallest zones of inhibition were found for the isolate from sample 7, indicating that this bacteria was the most resistant among isolated *Staphylococcus*.

For studies of antimicrobial activity of *Bacillus* SMIA-2 cells, the BHI was used, since it was able to support both growth of *Bacillus* sp SMIA-2 and the *Staphylococcus* isolates. Thus, for a correct assessment of the interaction between SMIA-2 and the selected pathogens, all of them were all grown in the same medium and in their best environmental growth conditions. According to the modification of the agar spot antimicrobial assay used in this work, a clear zone of more than 1 mm around the spot is considered as positive (JACOBSEN et al., 1999).

Although, no inhibitory zones were observed for the bacteria *Enterobacter aerogenes* and *Enterococcus* sp., some inhibitory halo in the presence of SMIA-2 cells were observed by the *Staphylococcus* sp. isolates indicating the antagonism between bacteria.

Despite the difficulty of comparing the size of the inhibitory halo of the commercial antibiotic with that of the SMIA-2 because of the not perfectly circular zones of inhibition, it was found that the inhibition zones found by *Staphylococcus* isolated from the sample 7 were similar to the antibiotics azithromycin, doxycycline and sulfamethoxazole + trimethoprim, which promoted satisfactory inhibition of this microorganism. However, comparing the results of the zones of inhibition obtained with most of the tested antibiotics and those of SMIA-2, the values (mm) were significantly much lower.

YILMAZ et al. (2006) reported several strains of *Bacillus* spp. isolated from soils that did not show inhibitory effects against Gram-negative strains, but that were effective against *Staphylococcus aureus*. Moreover, MENDO et al. (2004) reported a thermostable *Bacillus licheniformis* strain, which demonstrated activity against several Gram-positive strains such as *Bacillus subtilis* ATCC 14593, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 and *Staphylococcus aureus* (MOSHAFI et al., 2011; AL-SARAIREH et al., 2015; CHU et al., 2019; GUO et al., 2012).

The antagonistic activity of one microorganism against another can be caused by several factors including production of antimicrobials substances. BERNARDO et al. (2020) related that the SMIA-2 strain genome harbors genes encoding three non-ribosomal peptides involved in the biosynthesis of secondary metabolite that showed 100% identity with lichenysins, 53% with fengycins and 46% with bacillibactin when compared with other known clusters. All of them were reported as compounds with potent antimicrobial activities. (DISCHINGER et al., 2009).

Given the results found in this work and considering that SMIA-2 is not a pathogenic strain, products for cleaning and sanitizing surfaces containing SMIA spores can be developed. According to CASELLI et al. (2016) and CASELLI (2017), *Bacilli* spores can germinate on dry inanimate surfaces, generating the bacterial vegetative forms

which counteract the growth of pathogens and effectively substitute for them on treated surfaces. Also according to these same authors, this procedure did not select resistant species, but conversely induced an evident decrease of antibiotic resistance genes in the contaminating microbial population.

CONCLUSION

The observations made in this study revealed that the presence of several strains of bacteria with pathogenic potential resistant to commercial antibiotics is present in veterinary surgical centers and that effective measures of environmental disinfection must be taken to prevent hospital infections. *Bacillus lincheniformis* SMIA-2 demonstrated potential for antimicrobial activity against some strains of bacteria of the genus *Stapylococcus* sp., but further studies are need using the antimicrobial compounds produced by this species of bacillus.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

AL-SARAIH, H. et al. Antimicrobial activity of secondary metabolites from soil *Bacillus* sp. 7B1 isolated from south Al-Karak, Jordan. **Jordan Journal of Biological Sciences.**, v. 8, n. 2 p. 127-132, jun. 2015. Available from: <<http://jjbs.hu.edu.jo/files/v8n2/binder8n2.pdf>>. Accessed: Jul. 15, 2020.

ANDRADE, M. A. et al. Frequência de bactérias isoladas no ambiente, em feridas cirúrgicas, em médicos veterinários, enfermeiros e auxiliares de enfermagem: infecção em hospital veterinário. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 21, n. 1, p. 101-111, dec. 2007. Available from: <<https://www.revistas.ufg.br/pat/article/view/2606/2588>>. Accessed: Jul. 15, 2020.

ANDRADE, M.V.V. et al. Production and partial characterization of alkaline polygalacturonase secreted by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 under submerged culture using pectin and corn steep liquor. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 31, p. 204-208, 2011. doi:<https://doi.org/10.1590/S0101-20612011000100031>.

AVANCINI, C.A.M.; GONZÁLES, H.N. Micro-organismos isolados em superfícies de mesas de exames e procedimentos descontaminadas de hospital veterinário e a inativação in vitro por desinfetantes. **Veterinária e Zootecnia**, v. 21, n. 3, p. 440-450, 2014.

BAZÍLIO, L. E. P. et al. Detecção de *Staphylococcus* sp. metilina resistente em centro cirúrgico de grandes animais. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 3, n. 1, p. 8-13, sep. 2016. Available from: <<http://www.periodicos.uem.br/ojs/index.php/RevCiVet/article/view/32825>>. Accessed: Jul. 15, 2020. doi: 10.4025/revcivet.v3i1.32825.

BENITEZ, L. et al. Antimicrobial Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* LBM 5006 is Enhanced in the Presence of *Escherichia coli*. **Curr Microbiol**, v. 62, p. 1017 - 1022, 2011. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9814-z>

BERNARDO, S. P. C. et al. Draft genome sequence of thermophilic bacterium *Bacillus licheniformis* SMIA-2, an antimicrobial- and thermostable enzyme producing isolate from Brazilian soil. **Microbiol Resour Announc**, v. 9, n. 17, e00106-20, apr. 2020. Available from: <<https://mra.asm.org/content/ga/9/17/e00106-20.full.pdf>>. Accessed: Jul. 15, 2020. doi: 10.1128/MRA.00106-20.

BOERLIN P. et al. Molecular epidemiology and genetic linkage of macrolide and aminoglycoside resistance in *Staphylococcus intermedius* of canine origin. **Vet Microbiol.**, v. 79, p. 155-69, 2001. doi: 10.1016/s0378-1135(00)00347-3. PMID: 11230937.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Medidas de Prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. Brasília: Anvisa, 2017. Available from: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/3507912/Caderno+4+-+Medidas+de+Preven%C3%A7%C3%A3o+de+Infec%C3%A7%C3%A3o+Relacionada+%C3%A0+Assist%C3%A2ncia+%C3%A0+Sa%C3%BAde/a3f23dfb-2c54-4e64-881c-fccf9220c373>>. Accessed: Jul. 15, 2020.

CARVALHO, R.V. et al. Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus* sp. e hidrólise de amidos pela ação da enzima. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 380-386, 2008a. doi:<https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000200017>.

CARVALHO, R.V. et al. Properties of an amylase from thermophilic *Bacillus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 102-107, 2008b. doi:<https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000100023>.

CASELLI, E. Hygiene: microbial strategies to reduce pathogens and drug resistance in clinical settings. **Microb Biotechnol.** v. 10, p. 1079-1083, 2017. doi: 10.1111/1751-7915.12755.

CASELLI, E. et. al. Impact of a Probiotic-Based Cleaning Intervention on the Microbiota Ecosystem of the Hospital Surfaces: focus on the Resistome Remodulation. **PLoS One**. v. 11, e0148857, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0148857.

CHAVALI, A.K.; RHEE, S.Y. Bioinformatics tools for the identification of gene 68 clusters that biosynthesize specialized metabolites. **Brief Bioinform**, v. 19, p. 1022-1034, 2018. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx020>

CHU, J. et al. Isolation and identification of new antibacterial compounds from *Bacillus pumilus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 20, p. 8375-838, oct. 2019. Available from: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-019-10083-y>>. Accessed: Jul. 15, 2020. doi: 10.1007/s00253-019-10083-y.

COSTA, E. A. et al. Sugarcane bagasse and passion fruit rind flour as substrates for cellulase production by *Bacillus* sp. SMIA-2 strain isolated from Brazilian soil. **Open Access Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 2, 1-8, 2017. doi:<https://doi.org/10.23880/OAJMB-16000115>.

COVENTRY, M.J. et al. Production of brevicin 286 by *Lactobacillus brevis* VB286 and partial characterization. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 80, p. 91-98, 1996. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1996.tb03194.x>.

CRUZ, E. et al. Optimization of Food-Waste Based Culture Medium for Cellulase Production by Thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and effect of Divalent Metal Ions on Activity and Stability of the Enzyme at Higher Temperatures. **International Journal of Advanced Engineering Research and Science**, v. 6, p. 331-337, 2019. doi:<https://dx.doi.org/10.22161/ijaers.6741>.

DISCHINGER, J. et al. Production of the Novel Two-Peptide Lantibiotic Lichenicidin by *Bacillus licheniformis* DSM 69 13. **PLOS ONE**, v. 4, e6788, 2009. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006788>

FERREIRA, A. M. et al. *Staphylococcus aureus* resistente à metilina em superfícies de uma Unidade de Terapia Intensiva. **Acta paul. enferm.**, São Paulo, v. 24, n. 4, p. 453-458, 2011. Available from: <https://www.scielo.br/pdf/ape/v24n4/pt_a02v24n4.pdf>. Accessed: Jul. 15, 2020. doi: 10.1590/S0103-21002011000400002.

GARRETT, T. R. et al. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, v. 18, n. 9, p. 1049-1056, sep. 2008. Available from:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1002007108002049>>. Accessed: Jul. 15, 2020. doi: 10.1016/j.pnsc.2008.04.001.

GODOY, I. de et al. Antimicrobial susceptibility profiles of *Staphylococcus* spp. from domestic and wild animals. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 46, n. 12, p. 2148-2151, dec. 2016. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782016001202148&lng=en&nrm=iso>. Accessed: Jul. 15, 2020. doi: 10.1590/0103-8478cr20160373.

GUO, Y. et al. Identification of a new *Bacillus licheniformis* strain producing a bacteriocin-like substance. **The Journal of Microbiology.**, v. 50, n. 3, p. 452-458, jun. 2012. doi: 10.1007/s12275-012-2051-3.

HOEKSTRA, K.A.; PAULTON, R.J.L. Clinical prevalence and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staph. intermedius* in dogs. **J Appl Microbiol.**, v. 93, p. 406-413, 2002. doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01708.x. PMID: 12174038.

JACOBSEN, C. N. et al. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. **Appl Environ Microbiol.**, v. 65, n. 11, p. 4949–4956, nov. 1999. Available from: <<https://aem.asm.org/content/aem/65/11/4949.full.pdf>>. Accessed: Jul. 15, 2020.

LABORCLIN – Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda. Manual de Antibiograma 2019, rev. 16, mar. 2019. Available from: <<https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2019/05/Manual-Antibiograma-BRCAS-2019.pdf>>. Accessed: Jul. 15, 2020.

LADEIRA, S. A. et al. Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and its detergent compatibility. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, p. 110-115, 2015. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.12.008>.

MALIK, S. et al. Antibiotic resistance in staphylococci associated with cats and dogs. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 1283-1293, 2005. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02699.x

MENDO, S. et al. Purification and characterization of a new peptide antibiotic produced by a thermotolerant *Bacillus licheniformis* strain. **Biotechnol Lett**, v. 26, p. 115–119, 2004. doi.org/10.1023/B:BILE.0000012888.72489.3f.

MOSHAFI, M. H. et al. Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. Strain FAS1 isolated from soil. **Pak. J. Pharm. Sci.** v. 24, n. 3, p. 269-275, jul. 2011.

NWAGU, T. N. et al. Evaluation of the probiotic attributes of *Bacillus* strains isolated from traditional fermented African locust bean seeds (*Parkia biglobosa*), “daddawa”. **Ann Microbiol**, v. 70, n. 20, p. 1-15, 2020. Available from: <<https://annalsmicrobiology.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s13213-020-01564-x>>. Accessed: Jul. 15, 2020. doi: 10.1186/s13213-020-01564-x.

OLIVEIRA, L.R.C. et al. Extracellular production of avicelase by the thermophilic soil bacterium *Bacillus* sp. SMIA-2. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 36, p. 215-222, 2014. doi:[https:// Doi:10.4025/actascibiolsci.v36i2.17827](https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v36i2.17827).

RUBIN, J.E; CHIRINO-TREJO, M. Prevalence, sites of colonization, and antimicrobial resistance among *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from healthy dogs in Saskatoon, Canada. **J Vet Diagn Invest.**, v. 23, n. 2, p. 351-354, mar. 2011. Available from: <<https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/104063871102300227>>. Accessed: Jul. 15, 2020. doi:10.1177/104063871102300227.

SANTOS, A. L. dos et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, p. 413-423, dec. 2007.

Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442007000600005&lng=en&nrm=iso>. Accessed: Jul. 15, 2020. doi: 10.1590/S1676-24442007000600005

SANTOS L. H. et al. Contaminação ambiental em um hospital veterinário e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das bactérias isoladas. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 2, p. 384-389, jun. 2010. Available from: <<https://www.revistas.ufg.br/vet/article/view/2988>>. Accessed: Jul. 15, 2020.

SCHERER, C. B. et al. Frequency and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus pseudintermedius* in dogs with otitis externa. **Ciência Rural**, v. 48, n. 4, e20170738, may 2018. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782018000400453&lng=en&nrm=iso>. Accessed: Jul. 15, 2020. doi: 10.1590/0103-8478cr20170738.

SILVA, C.R. et al. Effect of the culture conditions on the production of an extracellular protease by thermophilic *Bacillus* sp. and some properties of enzymatic activity. **Brazilian Journal Microbiol.**, v. 38, p. 253-257, 2007. doi:<http://doi.org/10.1590/S1517-83822007000200012>.

SOUZA, A. N. de; MARTINS, M. L. L. Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 271-275, dec. 2001. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822001000400003&lng=en&nrm=iso>. Accessed: Jul. 15, 2020. doi:10.1590/S1517-83822001000400003.

STULL, J.W.; WEESE, J. S. Hospital-associated infections in small animal practice. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 45, n. 2, p. 217–233, mar. 2015. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7132463/>>. Accessed: Jul. 15, 2020. doi: 10.1016/j.cvsm.2014.11.009.

VANDINI, A. et al. Hard surface biocontrol in hospitals using microbial-based cleaning products. **PLoS One**, v. 9, n. 9, e108598, sep. 2014. Available from: <

<https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0108598&type=printable>>. Accessed: Jul. 15, 2020. doi:10.1371/journal.pone.0108598.

WEBER, T.; KIM, H.U. The secondary metabolite bioinformatics portal: computational tools to facilitate synthetic biology of secondary metabolite production. **Synthetic and Systems Biotechnology**, v. 1, p. 69-79, 2016. doi:10.1016/j.synbio.2015.12.002.

WILLARD, M. D.; SCULZ, K. S. Infecções cirúrgicas e seleção de antibióticos. In: FOSSUM, T. W. **Cirurgia de pequenos animais**. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. Cap. 9, p. 84-92.

YILMAZ, M. et al. Antimicrobial activities of some *Bacillus* spp. strains isolated from the soil. **Microbiological research**. v. 161, p. 127-31, 2006. doi:10.1016/j.micres.2005.07.001.

3.2 Remoção de biofilmes de *Staphylococcus aureus* isolado em centro cirúrgico veterinário por enzimas de *Bacillus* sp. SMIA-2 ²

RESUMO. - O *Staphylococcus aureus* é responsável por grande parte das infecções hospitalares e isso se deve principalmente à sua capacidade de desenvolver mecanismos de resistência a antimicrobianos e formar biofilmes em superfícies. As enzimas presentes nos produtos de limpeza desempenham um papel importante na higienização de equipamentos hospitalares e remoção dos biofilmes. O *Bacillus* sp. SMIA-2 é uma bactéria termofílica, não patogênica, produtora de esporos e de enzimas hidrolíticas termoestáveis, incluindo proteases. O objetivo desse trabalho foi avaliar a eficácia das enzimas do *Bacillus* sp. SMIA-2 na eliminação do biofilme formado por uma cepa de *Staphylococcus aureus* isolado em um centro cirúrgico veterinário em cupons de aço inoxidável AISI 304. As enzimas do *Bacillus* sp. SMIA-2 foram eficientes na redução do biofilme formado, com redução de 10000 vezes o valor de UFC.cm² com o T2 (solução tampão + enzimas do *Bacillus* sp. SMIA-2) e remoção total do biofilme com o T5 (solução detergente + enzimas do *Bacillus* sp. SMIA-2). Conclui-se que o *Bacillus* sp. SMIA-2 possui potencial para a formulação de um detergente enzimático para higienização de superfícies.

Palavras-chave: Infecção hospitalar, desinfecção, bactérias.

² Parte da tese de doutorado que será submetida em formato de artigo na revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

ABSTRACT. [Use of enzymes from *Bacillus* sp. SMIA-2 to enhance the action of detergents to remove biofilm formed by *Staphylococcus aureus* isolated from a veterinary surgical center.] *Staphylococcus aureus* is responsible for most hospital infections and this is mainly due to its ability to develop mechanisms of resistance to antimicrobials and to form biofilms on surfaces. The enzymes present in cleaning products play an important role in cleaning hospital equipment and removing biofilms. *Bacillus* sp. SMIA-2 is a thermophilic, non-pathogenic bacterium, producing spores and thermostable hydrolytic enzymes, including proteases. The objective of this research was to evaluate the efficacy of *Bacillus* sp. SMIA-2 in the elimination of biofilm formed by a strain of *Bacillus* sp. SMIA-2 in a veterinary surgical center in AISI 304 stainless steel coupons. *Bacillus* sp. SMIA-2 were efficient in reducing the biofilm formed, with a reduction of 10000 times the value of UFC.cm⁻² with T2 (buffer solution + enzymes from *Bacillus* sp. SMIA-2) and total removal of the biofilm with T5 (detergent solution + enzymes from *Bacillus* sp. SMIA-2). It is concluded that *Bacillus* sp. SMIA-2 has the potential for the formulation of an enzymatic detergent for surface cleaning.

Keywords: Hospitalar infections, disinfection, bacteria.

INTRODUÇÃO

Diversos microrganismos são responsáveis por infecções hospitalares em pacientes humanos e veterinários. O *Staphylococcus aureus* é uma das bactérias mais comuns e é a mais virulenta do seu gênero (Lima et al. 2015). Entre os fatores que contribuem para isso, pode-se citar, o fato de essa espécie sobreviver durante um período prolongado em superfícies (Andrade et al. 2007, Santos et al. 2007, Ferreira et al. 2011), principalmente na presença de matéria orgânica (Rossi et al. 2008), a capacidade de produzir biofilme (Santos Júnior et al. 2014) e de se replicar gerando cepas multirresistentes a antimicrobianos (Bazílio et al. 2016).

Um grande problema para contaminação de ambientes hospitalares por esses microrganismos é a formação de biofilmes em superfícies, que é definido como um agrupamento de microrganismos sésseis, aderidos a uma superfície ou outras células e envolvidos por uma matriz polimérica extracelular protetiva. A sua formação possui três eventos principais bem definidos: a adesão inicial, a maturação do biofilme e a dispersão (Lister & Horswill 2014).

A eliminação do biofilme não é um processo simples, já que estes constituem uma barreira física, protegendo as bactérias de detergentes e sanitizantes (Rossi & Porto 2009). Entre os produtos mais utilizados para limpeza de superfície e remoção do biofilme produzido pelo *Staphylococcus aureus*, destacam-se os detergentes enzimáticos (Lister & Horswill 2014, Stiefel et al. 2016). No Brasil, a Resolução da Diretoria Colegiada nº 55 de 14 de novembro de 2012, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, determina as normas para utilização e regulamentação dessa classe de sanitizante (Brasil 2012).

As enzimas presentes nos produtos de limpeza têm um papel importante na remoção de biofilmes microbianos, uma vez que desestabilizam as proteínas, polissacarídeos, lipídios e outras substâncias que fazem parte da sua composição (Stiefel et al. 2016). Em biofilmes, os microrganismos se tornam muito mais resistentes a tratamentos antimicrobianos, condições ambientais adversas e imunidade do hospedeiro (Li & Lee 2017). Portanto, a inclusão de enzimas nos produtos de limpeza facilita a remoção do biofilme que protege os microrganismos, permitindo uma maior eficácia dos agentes de limpeza. Com o aumento da prevalência da resistência aos antibióticos, enzimas antimicrobianas que visam à ruptura da maquinaria celular bacteriana e à formação de biofilme estão sob intensa investigação (Cesare et al. 2019).

Bactérias do gênero *Bacillus* estão entre os principais microrganismos produtores de enzimas para aplicação em detergentes (Danilova & Sharipova 2020). *Bacillus* sp. SMIA-2, uma bactéria termofílica isolada de amostras de solo (Souza & Martins 2001), revelou-se excelente produtor de várias enzimas hidrolíticas, incluindo proteases (Ladeira et al. 2010, Barbosa et al. 2014), amilases (Correa et al. 2011) e celulasas (Ladeira et al. 2015, Costa et al. 2017). A boa atividade apresentada pelas enzimas em uma ampla faixa de valores de pH, boa estabilidade e atividade a temperaturas relativamente elevadas, estabilidade na presença de surfactantes e oxidantes (Cruz et al. 2019, Ladeira et al. 2015), indicaram a possibilidade de aplicação dessas enzimas em formulações de limpeza biodegradáveis. Recentemente, Bernardo et al. (2020) sequenciaram todo genoma do SMIA-2 e identificaram genes que suportam a produção dessas enzimas, incluindo 6 genes para amilase, 13 loci para o metabolismo da xilose, 55 loci associados à degradação de proteínas, 3 loci de

enzimas celulolíticas, além de 5 grupos de genes envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas.

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a ação de um complexo enzimático rico em proteases produzido pelo SMIA-2 sobre a remoção de biofilme formado pelo *Staphylococcus aureus* em superfície de aço inoxidável AISI 304.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido conjuntamente pelo Instituto Federal do Espírito Santo – Campus Alegre e pelo Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. Uma formulação seca de complexo enzimático contendo proteases ($11,46\text{U mL}^{-1}$) e em menor quantidade, celulasas ($1,10\text{U mL}^{-1}$ avicelases e $0,13\text{U mL}^{-1}$ carboximetilcelulasas), amilases ($0,29\text{U mL}^{-1}$), xilanases ($0,30\text{U mL}^{-1}$) e poligalacturonases ($0,23\text{U mL}^{-1}$) produzidas por *Bacillus* sp. SMIA-2 foi utilizada neste trabalho (Bolzan 2021 - dados não publicados).

Remoção de biofilmes de cepas de *Staphylococcus aureus* em cupons de aço inoxidável.

Preparo e limpeza dos cupons de aço inoxidável

Foram utilizados cupons quadrados de aço inoxidável AISI 304 com medidas laterais de 1cm e espessura de 1mm (Fig. 1). A limpeza e preparo dos cupons seguiu metodologia utilizada por Rossoni & Gaylarde (2000), os quais foram limpos individualmente com acetona 100%, submersos por 60 minutos em detergente alcalino (NaOH 1%), enxaguados com água destilada estéril, limpos com etanol 70% (v/v), seguido por mais um enxague em água destilada estéril, secagem em estufa a 60°C por duas horas e autoclavagem a 121°C por 15 minutos.

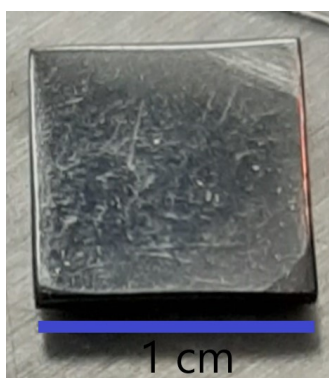


Fig. 1. Cupom padrão de aço inoxidável usado neste trabalho.

Preparo da suspensão de *Staphylococcus aureus*, processo de adesão e formação do biofilme

Culturas de *Staphylococcus aureus* isoladas de um centro cirúrgico veterinário do Instituto Federal do Espírito Santo – Campus de Alegre (Ifes/Alegre) foram previamente cultivadas e repicadas em meio de cultura TSA (Tryptone soya agar) para confirmação da pureza da cepa.

Em duas placas de Petri estéreis com 140mm de diâmetro, foram colocados 40 cupons de aço inoxidável AISI 304 previamente limpos e esterilizados e 60ml de caldo BHI inoculados com 10^8 UFC.ml⁻¹ da cultura de *Staphylococcus aureus*. As placas foram incubadas a 37°C com agitação orbital de 40rpm durante 144 horas para formação do biofilme.

Contagem de células viáveis aderidas aos cupons

Após o sexto dia de incubação, os cupons foram retirados em triplicata das placas de Petri contendo as culturas do *Staphylococcus aureus*, para enumerar as células aderidas. Cupons de aço inoxidável AISI 304 não submetidos ao processo de adesão foram considerados como controle, seguindo o protocolo proposto por Joseph et al. (2001).

Os cupons foram lavados com água peptonada 0,1% cinco vezes para remover as células plactônicas e, em seguida, as células aderidas no biofilme foram coletadas por meio de swabs estéreis. Estes foram transferidos para tubos contendo 10 ml água peptonada 0,1% estéril, os quais foram agitados por 2 minutos em um vórtex. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas de 1ml das alíquotas em outros tubos contendo 9ml de água peptonada estéril. A contagem de células viáveis foi realizada semeando-se 0,1ml de cada tubo diluído em placas de petri contendo TSA (Tryptone Soya Agar), por meio da técnica de semeadura superficial com auxílio de alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas e, em seguida, levadas para um contador de colônias manual para contagem. Os resultados obtidos foram expressos em UFC.cm⁻².

Avaliação da eficiência das soluções de limpeza na remoção dos biofilmes de *S. aureus*

Os seguintes tratamentos foram avaliados quanto à eficiência na remoção do biofilme de *Staphylococcus aureus* nos cupons de aço inoxidável:

T1 - Água da torneira coletada imediatamente antes da realização do experimento;

T2 - Solução composta de 1% Na₂CO₃/glycine (30:70) e 1% (m/v) enzimas do SMIA-2 - (Controle positivo);

T3 - Detergente comercial enzimático (1:1000 v/v);

T4 - Detergente comercial com suas enzimas inativadas (1;1000 v/v);

T5 - Detergente comercial com suas enzimas inativadas + extrato seco contendo as enzimas do *Bacillus* sp. SMIA-2 (1% m/v).

O Detergente comercial Riozyme ECO (Rioquímica Indústria Farmacêutica, São José do Rio Preto, SP, Brasil) foi diluído em água de torneira, seguindo recomendação do fabricante na proporção de 1:1000 (v/v).

Para a inativação das enzimas que fazem parte da sua formulação o detergente foi tratado termicamente a 100 °C por 15 minutos.

As soluções de limpeza (20ml) foram preparadas imediatamente antes da realização dos experimentos e foram transferidas para frascos estéreis.

Cupons de aço inox retirados das placas de Petri, após o sexto dia de incubação, foram individualmente lavados com água peptonada a 0,1% (m/v) cinco vezes para remover as células plactônicas e, em seguida, imersos nos frascos contendo as soluções de limpeza dos respectivos tratamentos. Os frascos foram imersos em banho-maria digital a 40°C para padronização de temperatura.

Os cupons foram higienizados individualmente em uma etapa de pré-lavagem durante cinco minutos, seguida por uma etapa de lavagem, em outro frasco estéril contendo mais 20 ml da solução de limpeza semelhante à etapa anterior durante mais 5 minutos e, finalmente, duas etapas de enxague em dois frascos Becker de 100ml estéreis contendo 20ml de água destilada estéril, na qual foi realizado o turbilhamento a cada 5 segundos, durante o período de 2 minutos com auxílio de uma micropiteta calibrada para volume de 1ml.

Após a etapa de enxague, foi realizada contagem das células aderidas ao cupom, conforme metodologia utilizada por Joseph et al. (2001) e descrita previamente.

Análise estatística. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata e os dados foram submetidos ao teste de Tukey em 1% de probabilidade no programa SAEG, versão 9.1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cupons de aço inoxidável AISI 304 foram usados para a formação do biofilme de *Staphylococcus aureus*. Também chamado de austenítico, o aço 304 contém pelo menos 18% de Cromo e 8% de Níquel e é o metal mais utilizado pela maioria das indústrias em razão de sua resistência mecânica à corrosão e da facilidade de limpeza (Lucchesi 2012). O cromo possui alta afinidade pelo oxigênio e a combinação desses dois elementos resulta na formação de uma fina camada de óxido de cromo, responsável pela resistência à corrosão e pela hidrofobicidade do aço inoxidável (Boari et al. 2009). Quanto mais hidrofóbica a célula bacteriana, maior será sua capacidade de ligar diretamente a esta superfície.

A cepa de *Staphylococcus aureus* usada neste trabalho para a formação do biofilme foi isolada de uma mesa cirúrgica do Centro Cirúrgico Veterinário (Ifes, ES, Brasil). De acordo com estudos realizados previamente, essa cepa foi sensível aos antibióticos amicacina, ceftriaxona, ciprofloxacina, gentamicina e sulfametoxazol + trimetoprim e resistente a amoxicilina + clavulanato de potássio, cefalexina e cefalotina.

Os cupons apresentaram após o processo de adesão uma contagem de *Staphylococcus aureus* de $1,0 \times 10^7$ UFC.cm⁻², mostrando que o processo utilizado foi eficiente para a formação do biofilme (Fig. 2). Segundo Boari et al. (2009), houve formação de biofilme por *S. aureus* em cupons de aço inoxidável AISI 304 (10 × 20mm) imersos em leite nas primeiras 48 horas a 18°C, chegando a valores de $1,7 \times 10^8$ UFC.cm⁻². Santos Júnior et al. (2014) avaliaram a quantidade de UFC.cm² presentes no biofilme formado pelo *Staphylococcus aureus* em aço inoxidável AISI 304, cujo meio de

crescimento utilizado foi o TSB (Tryptone Soya Broth), e igualmente encontraram valores médios superiores a 10^7 UFC.cm⁻² em um período de 144 horas. No presente estudo, o meio BHI (Brain Heart Infusion) também se mostrou eficiente na formação do biofilme. O BHI é um meio de cultura rico em nutrientes, que é amplamente utilizado para o crescimento de uma variedade de microrganismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos, mesmo daqueles mais exigentes (Kadam et al. 2013, Yang et al. 2018).

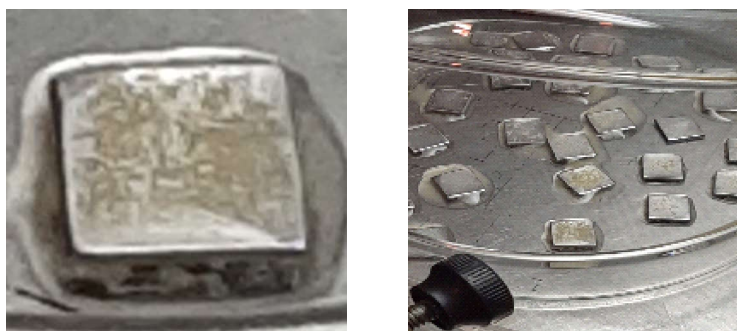


Fig. 2. Imagens do cupom de aço inoxidável com biofilme formado pelo *Staphylococcus aureus*.

Diferentes estratégias são usadas para remover biofilmes já consolidados (Marsch et al. 2014). O uso de produtos químicos é uma maneira de remover biofilmes de superfícies contaminadas. Entretanto, os compostos químicos não conseguem eliminar as células por causa dos seus mecanismos de resistência ou de tolerância, ou até podem eliminar todas as células, mas a matriz constituída de substâncias poliméricas extracelulares ainda permanece na superfície do material e pode promover recolonização, servindo como locais de ancoragem e fonte de nutrientes (Neu et al. 1992, Sutherland 2001). A utilização de enzimas degradantes da matriz, tais como proteases, xilanases, pectinases, amilases e celulases produzidas por microrganismos, é uma alternativa para o rompimento da matriz. Neste trabalho, após a formação do biofilme de *S. aureus* nos cupons de aço inoxidável, a eficácia de soluções de limpeza contendo enzimas do SMIA-2 para a sua remoção foi avaliada. A limpeza dos cupons utilizando apenas água da torneira (T1) reduziu a quantidade de colônias em 10 vezes ($1,0 \times 10^6$ UFC.cm⁻²) (Fig. 3).

A limpeza dos cupons com o detergente enzimático comercial (T3) e com o mesmo detergente com suas enzimas inativadas (T4) resultou na obtenção de valores diferentes para o Log UFC.cm², isto é, menores valores foram encontrados nos cupons submetidos à limpeza com o detergente sem a inativação das enzimas, mostrando a importância destas para melhorar a eficácia do detergente. Embora tenha sido observada redução das UFC.cm⁻², não houve a remoção completa do biofilme. Entretanto, apesar de não ter proporcionado a descontaminação necessária, seu uso representou um protocolo de limpeza eficaz para a redução da carga biológica. Segundo Stiefel et al. (2016), a incorporação de enzimas apropriadas em detergentes melhorou significativamente o desempenho de limpeza de endoscópios. Nesse estudo, os pesquisadores descobriram uma remoção de 95% de *Staphylococcus aureus* em um sistema de placa de 96 poços.

Resultados similares foram encontrados em relação à limpeza dos cupons com a solução composta de 1% Na₂CO₃/glycine (30:70) e 1% (m/v) enzimas do SMIA-2 (T2)

e a limpeza com o detergente comercial (T3). Mas, a limpeza dos cupons com o detergente comercial com suas enzimas inativadas e substituídas pelas enzimas do SMIA-2 (1%, m/v) removeu completamente o biofilme de *S. aureus* aderido aos cupons, demonstrando que essas enzimas potencializaram a ação do detergente comercial. O *S. aureus* na forma de biofilme torna-se mais resistente aos agentes sanitizantes por causa da baixa penetração dos compostos antimicrobianos, entre outros fatores.

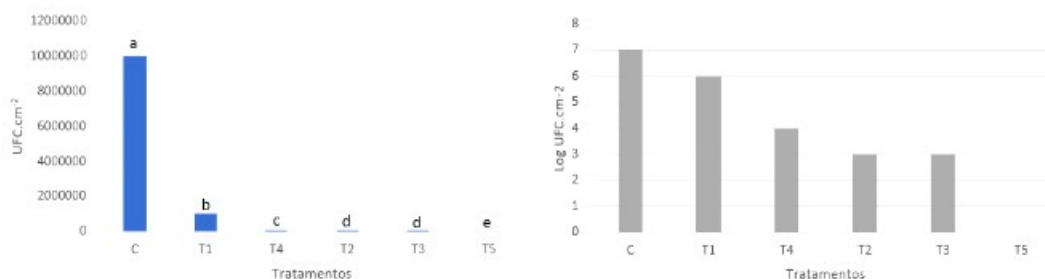


Fig. 3. Valores médios de UFC.cm⁻² e Log UFC.cm⁻² após a limpeza utilizando os diferentes tratamentos. Médias seguidas por letras distintas apresentam diferença estatística pelo teste Tukey em 1% de significância.

A utilização de detergentes enzimáticos, principalmente os que possuem proteases em sua composição, tem apresentado eficácia na dispersão de biofilmes e desinfecção de superfícies (Lister & Horswill 2014, Stiefel et al. 2016). A eficiência de proteases e de outras enzimas na remoção do biofilme do *S. aureus* se deve à degradação das proteínas e dos carboidratos, que são os principais componentes da matriz (Boles & Horswill 2011). Portanto, surfactantes e outros componentes não enzimáticos contidos em detergentes melhoram seu desempenho na eliminação do biofilme em razão da ação das enzimas sobre os compostos que constituem o biofilme (Stiefel et al. 2016). O presente trabalho demonstrou o efeito benéfico da adição do complexo enzimático de *Bacillus* sp. SMIA-2 ao detergente comercial para a eliminação do biofilme de *S. aureus* em superfície de aço inoxidável AISI 304, nas condições testadas.

CONCLUSÃO

O complexo enzimático, constituído principalmente por proteases de *Bacillus* sp. SMIA-2, reduziu em 10000 vezes a quantidade de UFC.cm² de *Staphylococcus aureus* utilizado nesse estudo. A adição das enzimas ao detergente comercial promoveu a eliminação completa do biofilme.

REFERÊNCIAS

- Andrade M.A., Mesquita A.J.D., Silva L.A.F.D. & Paulo N.M. 2007. Frequência de bactérias isoladas no ambiente, em feridas cirúrgicas, em médicos veterinários, enfermeiros e auxiliares de enfermagem: infecção em hospital veterinário. *Pesquisa Agropecuária Tropical*. 21(1): 101-111.
- Barbosa J.B., Ladeira S.A. & Martins M.L.L. 2014. Cheese whey and passion fruit rind flour as substrates for protease production by *Bacillus* sp. SMIA-2 strain isolated from Brazilian soil. *Biocatalise & Biotransformation*. 32(4): 244-250. <<https://doi.org/10.3109/10242422.2014.934363>>
- Bazílio L.E.P, Bordin J.T., Granemann M.C., Sfaciotte R.A.P., Vignoto V.K.C., Osaki S.C., Munhoz P.M. & Wosiacki S.R. 2016. Detecção de *Staphylococcus* spp. meticilina resistente em centro cirúrgico de grandes animais. *Rev. Ciên. Vet. Saúde. Públ.* 3(1): 8-13. <<https://doi.org/10.4025/revcivet.v3i1.32825>>
- Bernardo S.P.C., Rosana A.R.R, Souza A.N., Chiorean S., Martins M.L.L. & Vederasb J.C. 2020. Draft Genome Sequence of the Thermophilic Bacterium *Bacillus licheniformis* SMIA-2, an Antimicrobial- and Thermostable Enzyme-Producing Isolate from Brazilian Soil. *Microbiology Resource Announcements*. 9 (17): e00106-20. <<http://doi:10.1128/MRA.00106-20>>
- Boari C.A., Alves M.P., Tebaldi V.M.R., Savian T.V. & Piccoli R.H. 2009. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 29(4): 886-895. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612009000400029>>
- Boles B.R. & Horswill A.R. 2011. Staphylococcal biofilm disassembly. *Trends Microbiol.* 19(9): 449-455. <[doi:10.1016/j.tim.2011.06.004](https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.06.004)>
- Brasil. 2012. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada nº 55 de 14 de novembro de 2012. Dispõe sobre os detergentes enzimáticos de uso restrito em estabelecimentos de assistência à saúde com indicação para limpeza de dispositivos médicos e dá outras providências. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0055_14_11_2012.html>. Acesso em: 16 mar. 2021.
- Cesare A.D., Caselli E., Lucchi A., Sala C., Parisi A., Manfreda G. & Mazzacane S. 2019. Impact of a probiotic-based cleaning product on the microbiological profile of broiler litters and chicken caeca microbiota. *Poultry Science*. 98(9): 3602-3610. <[doi:https://doi.org/10.3382/ps/pez148](https://doi.org/10.3382/ps/pez148)>
- Correa T.L.R, Moutinho S.K.S., Martins M.L.L. & Martins M.A. 2011. Simultaneous α -amylase and protease production by the soil bacterium *Bacillus* sp. SMIA-2 under submerged culture using whey protein concentrate and corn steep liquor:

- compatibility of enzymes with commercial detergents. *Food Science and Technology*. 31 (4): 843-848. <doi:<https://doi.org/10.1590/S0101-20612011000400003>>
- Costa E.A., Fernandes R.N., Cruz E., Moraes L.P., Carvalho R.V., Martins M.L.L. 2017. Sugarcane bagasse and passion fruit rind flour as substrates for cellulase production by *Bacillus* sp. SMIA-2 strain isolated from Brazilian soil. *Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2(1): 000115. doi:<https://doi.org/10.23880/OAJMB-16000115>.
- Cruz E., Moraes L.P.D., Costa E.A., Barbosa J.B. & Martins M.L.L. 2019. Optimization of Food-Waste Based Culture Medium for Cellulase Production by Thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and effect of Divalent Metal Ions on Activity and Stability of the Enzyme at Higher Temperatures. *International Journal Of Advanced Engineering Research And Science*. 6(7): 331 - 337.<doi:<https://doi.org/10.22161/ijaers.6741>>
- Danilova I. & Sharipova M. 2020. The Practical Potential of Bacilli and Their Enzymes for Industrial Production. *Frontiers in Microbiology*. 11: 1782. <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01782>>
- Ferreira A.M., Andrade D., Rigotti M.A. & Almeida, M.T.G. 2011. *Staphylococcus aureus* resistente à meticiina em superfícies de uma unidade de terapia intensiva. *Acta Paul. Enferm.* 24(4): 453-458. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-21002011000400002>>
- Joseph B, Otta S.K, Karunasagar I & Karunasagar I. 2001. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*. 64(3): 367-372 <[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00466-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00466-9)>
- Kadam S.R., Den Besten H. M., Van Der Veen S., Zwietering M. H., Moezelaar R. & Abee T. 2013. Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: impact of growth condition, serotype and strain origin. *Int J Food Microbiol*. 165(3): 259-264. <<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.025>>.
- Ladeira S.A., Andrade M.V.V., Delatorre A.B., Perez V.H. & Martins M.L.L. 2010. Protease production using agroindustrial residues by thermophilic *Bacillus* sp. in submerged fermentation: optimization of the culture medium using an experimental design approach. *Revista Química Nova*. 33(2):324-328. <doi:<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000200018>>
- Ladeira S.A., Cruz E., Delatorre A.B., Barbosa J.B. & Martins M.L.L. 2015. Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and its detergent compatibility. *Electronic Journal of Biotechnology*. 18 (2): 110-115. <doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.12.008>>
- Li XH. & Lee J.H. 2017. Antibiofilm agents: a new perspective for antimicrobial strategy. *J Microbiol*. 55(10): 753-766. <<http://doi:10.1007/s12275-017-7274-x>>
- Lima M.F.P., Borges M.A., Parente R.S., Júnior R., Caldeira V. & Oliveira M.E. 2015. *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares – revisão de literatura. *Revista Uningá Review*. 21(1): 32-39.

- Lister J. L. & Horswill A.R. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. 2014. *Celular and Infection Microbiology*. 4(178). <<https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00178>>
- Lucchesi E.G. 2012. Influência de diferentes materiais na formação e susceptibilidade de biofilmes a agentes antimicrobianos. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 178f.
- Marsch G., Mashaqi B., Burgwitz K., Bisdas T., Knigina L., Stiesch, M., Haverich A. & Kuehn C. 2014. Prevention of pacemaker infections with perioperative antimicrobial treatment: an in vitro study. *Europace*. 16(4): 604-611. <<https://doi.org/10.1093/europace/eut222>>
- Neu T.R., Van der Mei H.C. & Busscher H.J. 1992. Biofilms Associated with Health. In: Melo L.F., Bott T.R., Fletcher M., Capdeville B. (eds) *Biofilms — Science and Technology*. NATO ASI Series (Series E: Applied Sciences). Vol. 223. Springer, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-1824-8_3>
- Rossi A.C.R. & Porto E. 2009. A importância da elaboração de procedimentos de higienização considerando a presença de biofilmes. *SBCC*. 40(1).
- Rossi D., Devienne K.F. & Raddi M.S.G. 2008. Influência de fluídos biológicos na sobrevivência de *Staphylococcus aureus* sobre diferentes superfícies secas. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 29 (2):211-214.
- Rossoni E.M. & Gaylarde C.C. 2000. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *International Journal of Food Microbiology*. 61 (1): 81-85. <[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00369-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00369-X)>
- Santos A. L., Santos D.O., Freitas C.C., Ferreira B.L.A., Afonso I.F., Rodrigues C.R. & Castro H.C. 2007. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 43(6): 413-423. <<https://doi.org/10.1590/S1676-24442007000600005>>
- Santos Júnior A.C., Salimena A.P.S., Cardoso M.G., Alves E. & Picolli R.H. 2014. Action of sanitizers on *Staphylococcus aureus* biofilms on stainless steel and polypropylene surfaces. *African Journal of Microbiology Research*. 8 (36): 3347-3353. <DOI: 10.5897/AJMR2014.6983>
- Souza A.N. & Martins M.L.L. 2001. Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic Bacillus. *Brazilian Journal of Microbiology*. 32(4):271-275. <<https://doi.org/10.1590/S1517-83822001000400003>>
- Stiefel P., Mauerhofer S., Schneider J., Maniura-Weber K., Rosenberg U. & Ren Q. 2016. Enzymes enhance biofilm removal efficiency of cleaners. *Antimicrob Agents Chemother.* 60 (6): 3647–3652. <doi:10.1128/AAC.00400-16>
- Sutherland I.W. 2001. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.* 9 (5): 222-227. <[https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02012-1](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02012-1)>

Yang E., Fan L., Yan J., Jiang Y., Doucette C., Fillmore S. & Walker B. 2018. Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria. *AMB Express*. 8(10). < doi: 10.1186/s13568-018-0536-0 >

4. RESUMO E CONCLUSÕES

A presença de microrganismos multirresistentes e com potencial patogênico tem sido relatada por pesquisadores em artigos científicos e observada por profissionais que trabalham em atendimentos hospitalares. Esse trabalho confirma esses dados ao encontrar quatro espécies com potencial patogênico, sendo que algumas das cepas apresentaram resistência a antimicrobianos utilizados rotineiramente. O monitoramento rigoroso, a determinação de protocolos de limpeza e desinfecção eficaz, a realização de culturas e antibiogramas, tanto em superfícies quanto em pacientes com infecção hospitalar, o uso racional de antibióticos e a busca de novos desinfetantes e antimicrobianos são primordiais para prevenção e/ou eliminação desses microrganismos, bem como das infecções causadas por eles. O *Bacillus* sp. SMIA-2, que já possuía eficiência comprovada na produção de diversas enzimas para a indústria de alimentos, e recentemente, após seu ressequenciamento foram encontrados grupamentos genéticos responsáveis pela produção de peptídeos antimicrobianos. No presente estudo, o *Bacillus* sp. SMIA-2 também demonstrou eficiência na eliminação do biofilme formado por uma das cepas de *Staphylococcus aureus* isolada e ação antimicrobiana contra algumas dessas bactérias. Dessa forma, o *Bacillus* sp. SMIA-2 torna-se uma ferramenta para atuação nos dois campos: fonte de produção de enzimas utilizadas em detergentes enzimáticos com finalidade de limpeza hospitalar e para investigação sobre novas substâncias antimicrobianas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Algburi, A., Al-Hasani, H. M., Ismael, T. K., Abdelhameed, A., Weeks, R., Ermakov, A. M., Chikindas, M. L. (2020). Antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* KATMIRA 1933 and *Bacillus amyloliquefaciens* B-1985 against *Staphylococcus aureus* biofilms isolated from wound infection. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13 (1):125-134.
- Al-saraireh, H., Al-zereini, W. A., Tarawneh, K. A. (2015). Antimicrobial activity of secondary metabolites from soil *Bacillus sp.* 7B1 isolated from south Al-Karak, Jordan. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 8 (2): 127-132.
- Amin, M., Rakhisi, Z., Ahmady, A.Z. (2015). Isolation and Identification of *Bacillus* species from soil and evaluation of their antibacterial properties. *Avicenna J Clin Microb Infec*, 2 (1): 1-4.
- Andrade, M. A., Mesquita, A. J. D., Silva, L. A. F. D., Paulo, N. M. (2007). Frequência de bactérias isoladas no ambiente, em feridas cirúrgicas, em médicos veterinários, enfermeiros e auxiliares de enfermagem: infecção em hospital veterinário. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 21 (11): 101-111.
- Arias, M. V. B., Aiello, G., Battaglia, L. A., Freitas, J. C. (2013). Estudo da ocorrência de infecção hospitalar em cães e gatos em um centro cirúrgico veterinário universitário. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33 (6): 771-779.
- Avancini, C. A. M., Gonzáles, N. H. (2014). Micro-organismos isolados em superfícies de mesas de exames e procedimentos descontaminadas de hospital veterinário e a inativação *in vitro* por desinfetantes. *Veterinária e Zootecnia*, 21 (3): 440-450.
- Barbosa, J.B., Ladeira, S.A., Martins, M.L.L. (2014). Cheese whey and passion fruit rind flour as substrates for protease production by *Bacillus sp.* SMIA-2 strain isolated from Brazilian soil. *Biocatalise & Biotransformation*, 32 (4): 244-250.

- Bazílio, L. E. P., Bordin, J. T., Granemann, M. C., Sfaiotte, R. A. P., Vignoto, V. K. C., Osaki, S. C., Munhoz, P. M., Wosiacki, S. R. (2016). Detecção de *Staphylococcus* sp. metilina resistente em centro cirúrgico de grandes animais. *Rev. Ciên. Vet. Saúde. Públ.*, 3 (1): 8-13.
- Bernardo, S.P.C., Rosana, A.R.R, Souza, A.N., Chiorean, S., Martins, M.L.L., Vederasb, J.C. (2020). Draft Genome Sequence of the Thermophilic Bacterium *Bacillus licheniformis* SMIA-2, an Antimicrobial- and Thermostable Enzyme-Producing Isolate from Brazilian Soil. *Microbiology Resource Announcements*, 9 (17): 1-3.
- Bertona, E., Radice, M., Rodríguez, C. H., Barberis, C., Way, C., Famiglietti, A., Gutkind, G. (2005). Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia enzimática de las cefalosporinas de tercera generación en *Enterobacter* spp. *Revista Argentina de Microbiología*, 37: 203-208.
- Boles, B. R., Horswill, A. R. (2008). agr-Mediated Dispersal of *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Plos pathogens*, 4 (4): 1-13.
- Boles, B. R., Horswill, A. R. (2011). Staphylococcal biofilm disassembly. *Trends Microbiol.* 19 (9): 449-455.
- BRASIL, 1998. Portaria n° 2616, de 12 de maio de 1998 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <[www.anvisa.gov.br/servicos/saude/manuais/microbiologia.asp](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/1998/prt2616_12_05_1998.html#:~:text=Considerando%20as%20determina%C3%A7%C3%B5es%20da%20Lei,de%20Controle%20de%20Infec%C3%A7%C3%B5es%20Hospitalares.>></p>
<p>BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde. Brasília, 2004. <a href=). Acesso em: 14 mar. 2018.
- BRASIL. 2012. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada n 15 de 15 de março de 2012. Dispõe sobre requisitos de boas práticas para o processamento de produtos para saúde e dá outras providências. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0015_15_03_2012.html>. Acesso em: 18 mar. 2021.
- BRASIL. 2012. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada n 55 de 14 de novembro de 2012. Dispõe sobre os detergentes enzimáticos de uso restrito em estabelecimentos de assistência à saúde com indicação para limpeza de dispositivos médicos e dá outras providências. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0055_14_11_2012.html>. Acesso em: 16 mar. 2021.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Medidas de Prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde*. Brasília: Anvisa, 2017. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/3507912/Caderno+4+-+Medidas+de+Preven%C3%A7%C3%A3o+de+Infec%C3%A7%C3%A3o+Rela>>

[cionada+%C3%A0+Assist%C3%A0ncia+%C3%A0+Sa%C3%BAde/a3f23dfb-2c54-4e64-881c-fccf9220c373>](https://doi.org/10.1590/S1518-8789.20200373). Acesso em: 15 jul. 2020.

- Centuri3n, M. P. B., Silva, A. S., Lopes, L. S., Rom3o, C. M. C. P. A. (2019). Detergentes enzim3ticos no reprocessamento de produtos para sa3de. *Vigil. Sanit. Debate*, 7 (1): 33-41.
- Cercenado, E. (2011). *Enterococcus*: resistencias genot3picas y fenot3picas y epidemiologia em Espa3a. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 29 (5): 59-65.
- Chu, J., Wang, Y., Zhao, B., Zhang, X., Liu, K., Mao, L., Kalamiyets, E. (2019). Isolation and identification of new antibacterial compounds from *Bacillus pumilus*. *Applied Microbiology and Biotechnology.*, 103 (14): 8375-8381.
- Correa T. L. R, Moutinho S. K. S., Martins M. L. L., Martins, M. .A. (2011). Simultaneous α -amylase and protease production by the soil bacterium *Bacillus* sp. SMIA-2 under submerged culture using whey protein concentrate and corn steep liquor: compatibility of enzymes with commercial detergents. *Food Scienc and Technology*, 31 (4): 843-848.
- Costa, E. A., Fernandes, R. N., Cruz, E., Moraes, L. P., Carvalho, R. V., Martins, M. L. L. (2017). Sugarcane bagasse and passion fruit rind flour as substrates for cellulase production by *Bacillus* sp. SMIA-2 strain isolated from Brazilian soil. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2 (1): 1-8.
- Cruz, E. (2017). *Estudos sobre a estabilidade de celulasas de Bacillus sp. smia-2*. Disserta33o (Mestrado em Produ33o Vegetal) - Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 63p.
- Ehling-Schulz, M., Lereclus, D., Koehler, T. M. (2019). The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential. *Microbiol Spectr.*, 7 (3): 875-912.
- Ferreira, A. M., Andrade, D., Rigotti, M. A., Almeida, M. T. G. (2011). *Staphylococcus aureus* resistente 3 meticiina em superf3cies de uma unidade de terapia intensiva. *Acta Paul. Enferm.*, 24 (4): 453-458.
- Fio, F. S., Filho T. R. M., Groppo F. C. (2000) Resist3ncia bacteriana. *Revista Brasileira de Medicina*, 57 (10): 1129-1140.
- Foster, T. J., Geoghegan, J. A., Ganes,h C. K., Hook, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews: Microbiology*,12 (14): 49-62.
- Garrett, T. R., Bhakoo, M., Zhang, Z. (2008). Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, 18 (9): 1049-1056.
- Jorgensen, J. H., Ferraro, M. J. (1998). Antimicrobial Susceptibility Testing: General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases*, 26 (4): 973-980.
- Kiedrowski, M. R., Horswill, A. R. (2011). New approaches for treating staphylococcal biofilme infections. *Annals of the new York Academy of Sciences*, 1241 (1): 104-121.

- Ladeira, S. A., Cruz, E., Delatorre, A. B., Barbosa, J. B., Martins, M. L.L. (2015). Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and its detergent compatibility. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18 (2): 110-115.
- Ladeira, S. A. (2013). *Aproveitamento de resíduos agroindustriais para a produção de celulases e xilanases por espécies de Bacillus sp.* Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 164p.
- Lister, J. L., Horswill, A. R. Staphylococcus aureus biofilms: recent developments in biofilm dispersal (2014). *Celular and Infection Microbiology*, 4:1-9.
- Madigan, M.T., Mart Inko, J.M., Dunlap, P.V., Clark, D.P. (2010). *Microbiologia de Brock*. 12 ed. Porto Alegre: Artmed. 1160p.
- Maurer, K.H. (2004). Detergents proteases. *Current opinion in Biotechnology*, 15 (4): 330-334.
- Medeiros, A. C., Neto, T. A., Filho, A. M. D, Pinto Jr, F. E., Uchôa, R. A. C., Carvalho, M. R. (2003). Infecção hospitalar em pacientes cirúrgicos de hospital veterinário. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 18 (1): 15-18.
- Moraes, M. E., Silva, A. R. C., Oriani, R. G., Oliveira, P. C. (2012). Controle de infecção cirúrgica: contaminação em centro cirúrgico de pequenos animais. *PUBVET*, 6 (29): 1436-1442.
- Moshafi, M. H., Forootanfar, H., Ameri, A., Shakibaie, M., Dehghan-Noudeh, G., Razavi, M. (2011). Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. Strain FAS₁ isolated from soil. *Pak. J. Pharm. Sci*, 24 (3): 269-275.
- OMS. *Organização Mundial da Saúde. Global Guidelines for the prevention of surgical site infection*. 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/gpsc/ssi-prevention-guidelines/en/>>. Acesso em: 14 mar. 2018.
- Pan, Y, Breidt Jr., F., Kathariou, S. (2006). Resistance of *Listeria monocytogenes* Biofilms to Sanitizing Agents in a Simulated Food Processing Environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (12): 7711–7717.
- Pantosti, A., Sanchini, A., Monaco, M. (2007). Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol.*, 2 (3): 323-334.
- Petter, C. E., Farret, T. C. F., Scherer, J. S., Antonello, V. S. (2013). Fatores relacionados a infecções de sítio cirúrgico após procedimentos obstétricos. *Scientia Medica*, 23 (1): 28-33.
- Poveda, V. B., Galvão, C. M., Hayashida, M. (2003). Análise dos fatores de risco relacionados à incidência de infecção do sítio cirúrgico em gastrocirurgias. *Rev. Esc. Enferm. USP*, 37 (1): 81-89.
- Rossi, D., Devienne, K. F., Raddi, M. S. G. (2008). Influência de fluídos biológicos na sobrevivência de *Staphylococcus aureus* sobre diferentes superfícies secas. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, 29 (2): 211-214.

- Rutala, W. A.; Weber, D. J. (2008). *Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities, 2018*.
- Santos L. H., Neto, J. F. S., Rizzo, N. N., Bastiani, L. B. R., Barcellos, H. H. A., Brun, M. V. (2010). Contaminação ambiental em um hospital veterinário e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das bactérias isoladas. *Ci. Anim. Bras.*, 11 (2): 384-389.
- Santos, A. L., Santos, D. O., Freitas, C. C., Ferreira, B. L. A., Afonso, I. F., Rodrigues, C. R., Castro, H. C. (2007). *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, 43 (6): 413-423.
- Schulz, K. S. (2014). Princípios de assepsia cirúrgica. In: FOSSUM, T. W. *Cirurgia de pequenos animais*. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 1619 p.
- Sfaciotte, R. A. P., Vignoto, V. K. C., Pachaly, J. R., De Conti, J. B., Wosiaki, S. R. (2014). Determinação dos pontos críticos de contaminação e avaliação dos protocolos de desinfecção na área veterinária. *Rev. Ciên. Vet. Saúde Públ.*, 1 (1): 48-57.
- Smith, K. Hunter, I. H. (2008). Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. *Journal of Medical Microbiology*. 57 (8): 966-973.
- Stiefel, P., Mauerhofer, S., Schneider, J., Maniura_Weber, K., Rosenberg, U, Ren, Q. (2016). Enzymes enhance biofilme removal efficiency of cleaners. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 60 (6): 3647-3652.
- Tavares, W. (2014) Resistência bacteriana. In: Tavares, W. *Antibióticos e quimioterápicos para o clínico*. 3 ed. São Paulo: Editora Atheneu.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., Case, C. L. (2005). Procariotos: Domínios Bacteria E Archaea. In: Tortora, G. J., Funke, B. R., Case, C. L. *Microbiologia*. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 964 p.
- Trentin, D. S., Giordani, R. B., Macedo, A. J. (2013). Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. *Revista Liberato*, 14 (22): 113-238.
- Willard, M. D., Sculz, K. S. (2014). Infecções cirúrgicas e seleção de antibióticos. In: Fossum, T. W. *Cirurgia de pequenos animais*. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 84-92.