



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS**

**Lorena Dutra Silva**

**Estudo da distribuição de genes relacionados a efeitos probióticos e avaliação do potencial bacteriocinogênico em *Lacticaseibacillus rhamnosus***

**FLORIANÓPOLIS**

**2024**

**Lorena Dutra Silva**

**Estudo da distribuição de genes relacionados a efeitos probióticos e avaliação do potencial bacteriocinogênico em *Lacticaseibacillus rhamnosus***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do título de Doutora em  
Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi

**FLORIANÓPOLIS**

**2024**

#### Ficha de identificação da obra

Silva, Lorena Dutra

Estudo da distribuição de genes relacionados a efeitos probióticos e avaliação do potencial bacteriocinogênico em *Lactibacillus rhamnosus* / Lorena Dutra Silva ; orientadora, Ana Carolina Maisonnave Arisi, 2024.

104 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Genômica Comparativa. 3. Bacteriocina. 4. Garvieacina Q. 5. Microbiologia de Alimentos. I. Arisi, Ana Carolina Maisonnave. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

Lorena Dutra Silva

**Estudo da distribuição de genes relacionados a efeitos probióticos e avaliação do potencial bacteriocinogênico em *Lacticaseibacillus rhamnosus***

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Adriano Brandelli, Dr.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profª. Thaís Marques Sincero, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Juliano de Dea Lindner, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Ciência dos alimentos.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Profª. Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi

Orientadora

Florianópolis, 2024.

Este trabalho é dedicado aos meus pais, irmã e tias,  
por todo apoio e incentivo e ao Filipe por estar ao  
meu lado em todos os momentos.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação de Ciência dos Alimentos, pela oportunidade de realizar o doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À minha orientadora Profa. Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi pelos ensinamentos, orientações, incentivo, disponibilidade e confiança depositada na minha capacidade de realização deste projeto. Muito obrigada por tudo!

À Profa. Dra. Silvani Verruk pela receptividade, auxílio e pela concessão de amostras e reagentes para realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Isabela Maia Toaldo Fedrigo pela amizade, conselhos e pelos conhecimentos compartilhados.

A todos os professores da Pós-Graduação em dos Ciência dos Alimentos pelos ensinamentos e amizades.

Aos professores membros da banca por aceitarem o convite de participação e pelas considerações.

Aos colaboradores do Departamento de Ciência dos Alimentos por toda atenção e auxílio prestado.

Aos colegas da Pós-Graduação pela gentileza e conhecimentos compartilhados. Em especial ao Ivan pelo auxílio nos experimentos e às amigas Ana Paula e Vanessa pela amizade e ajuda sempre que foi preciso.

Ao grupo do Laboratório de Biologia Molecular: Ana Marina, Ana Gabriela, Bruna, Deyonara, Elisandra, Joana, Lúcia e Tuany pela amizade, convívio, ajuda, conselhos, paciência e deliciosos cafés.

À amiga Lúcia Lemos por todo apoio, auxílio nos experimentos, conhecimentos compartilhados e pelos agradáveis momentos que passamos juntas.

Ao meu noivo Filipe pelo amor, carinho, atenção e paciência que trouxeram leveza aos meus dias. Agradeço também por toda ajuda nas horas gastas me auxiliando com as análises deste trabalho e os valiosos conselhos e dicas.

Aos meus pais, a minha irmã e a todos os meus familiares por serem meu porto seguro e por todo amor, apoio e estímulos em meus estudos e na minha vida.

O meu profundo obrigada a todos vocês que foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

## RESUMO

A bactéria Gram-positiva *Lacticaseibacillus rhamnosus* tem sido amplamente estudada quanto aos seus efeitos benéficos para a saúde humana. Apesar disso, é consenso na literatura científica que os efeitos probióticos são cepa-dependentes, o que impede generalizações dos efeitos para espécies, particularmente àquelas com grande diversidade genômica. Poucas moléculas foram classificadas como efetoras probióticas, dentre essas, as adesinas e as bacteriocinas são duas classes de moléculas consideradas capazes de exercer efeitos probióticos. Uma vez que a diversidade genômica pode promover especializações de nicho em uma população bacteriana, criando filogrupos correlacionados e considerando a abundância de relatos e genomas disponíveis de cepas probióticas de *L. rhamnosus*, este trabalho investigou todos os genomas disponíveis publicamente dos gêneros *Lactobacillus* e *Lacticaseibacillus* para estudar o pan-genoma e a estrutura de população de *L. rhamnosus* e mapear a distribuição de adesinas e bacteriocinas nos genomas desta espécie. Oito filogrupos, PG1 a PG8, foram detectados na população de *L. rhamnosus*, constituída por 178 genomas. A espécie possui um pan-genoma aberto; PG1, PG3, PG4, e PG5 exibiram alta conservação gênica, ao passo que os outros filogrupos são mais heterogêneos. O operon de adesinas *spaCBA-srtC1* foi encontrado em 44 (24,7%) dos genomas; contudo, considerando somente o PG1, a prevalência foi de 65%. No PG2 a prevalência de *spaCBA-srtC1* foi de 43%. Tanto isolados da microbiota humana, quanto derivados de laticínios apresentaram o operon *spaCBA-srtC1*. Enquanto, que a distribuição do operon *spaCBA-srtC1* é esparsa, *spaFED-srtC2* é comum a todos os genomas de *L. rhamnosus*. Adicionalmente, dois principais tipos de clusters de genes de bacteriocinas foram encontrados (Bact1 e Bact2). O cluster Bact1 é composto pelo gene *garQ*, que codifica uma bacteriocina de classe II - Garvieacina Q e uma proteína de imunidade. Bact1 está majoritariamente presente nos filogrupos PG8A e PG2. O filogrupo PG2 possui duas populações distintas, contendo ou *spaCBA-srtC1* ou Bact1. Na segunda etapa deste estudo, com aquisição da cepa *L. rhamnosus* HN001 (PG2), a classificação taxonômica desta cepa foi confirmada, bem como a presença do operon *garQI*, o qual foi submetido à amplificação. O sequenciamento do amplicon *garQI* e sua posterior análise confirmou que o fragmento se trata da região *garQI*. Análises *in silico* revelaram que tanto *L. rhamnosus* HN001 quanto as demais doze cepas possuidoras de *garQI* possuem os genes *garCD*, que participam da síntese de proteínas de transporte e processamento da bacteriocina GarQ. Entretanto, os testes de inibição *in vitro* não foram eficazes em revelar efeitos inibitórios do sobrenadante de cultivo sobre as cepas indicadoras *Listeria monocytogenes* Scott A e *E. coli* ATCC 25922. Nossos resultados constituem novas evidências na distribuição de genes de relevância biotecnológica na população de *L. rhamnosus*, revelando padrões intra-espécie que podem auxiliar no desenvolvimento de produtos probióticos mais eficientes, além de constituir a etapa inicial na elucidação dos parâmetros envolvidos na síntese, secreção e atividade de Garvieacina Q por *L. rhamnosus* HN001.

Palavras-chave: Bacteriocina; Garvieacina Q; Genômica Comparativa; Microbiologia de Alimentos.

## ABSTRACT

The Gram-positive bacterium *Lacticaseibacillus rhamnosus* has been widely studied for its beneficial effects on human health. However, it is a consensus in the scientific literature that probiotic effects are strain-dependent, which hinders generalizations of effects to species, especially those with high genomic diversity. Few molecules have been classified as probiotic effectors, among these, adhesins and bacteriocins are two classes of molecules considered capable of exerting probiotic effects. Since genomic diversity can promote niche specializations in a bacterial population, creating correlated phylogroups and considering the abundance of reports and available genomes of *L. rhamnosus* probiotic strains, this work investigated all publicly available genomes of the genera *Lactobacillus* and *Lacticaseibacillus* to study the pan-genome and population structure of *L. rhamnosus* and map the distribution of adhesins and bacteriocins in the genomes of this species. Eight phylogroups, PG1 to PG8, were detected in the *L. rhamnosus* population, consisting of 178 genomes. The species has an open pan-genome; PG1, PG3, PG4, and PG5 exhibited high gene conservation, while the other phylogroups are more heterogeneous. The *spaCBA-srtC1* adhesin operon was found in 44 (24.7%) of the genomes; however, when considering only PG1, the prevalence was 65%. In PG2, the prevalence of *spaCBA-srtC1* was 43%. Both isolates from the human microbiota and those derived from dairy products presented the *spaCBA-srtC1* operon. While the distribution of the *spaCBA-srtC1* operon is sparse, *spaFED-srtC2* is common to all *L. rhamnosus* genomes. Additionally, two main types of bacteriocin gene clusters were found (Bact1 and Bact2). The Bact1 cluster is composed of the *garQ* gene, which encodes a class II bacteriocin - Garvicin Q and an immunity protein. Bact1 is predominantly present in phylogroups PG8A and PG2. The PG2 phylogroup has two distinct populations, containing either *spaCBA-srtC1* or Bact1. In the second stage of this study, with the acquisition of the *L. rhamnosus* HN001 strain (PG2), the taxonomic classification of this strain was confirmed, as well as the presence of the *garQI* operon, which was subjected to amplification. Sequencing of the *garQI* amplicon and subsequent analysis confirmed that the fragment corresponds to the *garQI* region. *In silico* analyzes revealed that both *L. rhamnosus* HN001 and the other twelve strains possessing *garQI* have the *garCD* genes, which are involved in the synthesis of transport and processing proteins of the bacteriocin GarQ. However, *in vitro* inhibition tests were not effective in revealing inhibitory effects of the culture supernatant on the indicator strains *Listeria monocytogenes* Scott A and *E. coli* ATCC 25922. Our results constitute new evidence on the distribution of genes of biotechnological relevance in the *L. rhamnosus* population, revealing intra-species patterns that can assist in the development of more efficient probiotic products, and constitute the initial step in elucidating the parameters involved in the synthesis, secretion and activity of Garvicin Q by *L. rhamnosus* HN001.

Keywords: Bacteriocin; Garvicin Q; Genomics Comparative; Food Microbiology.



## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1 – Revisão bibliográfica

Figura 1 – Mecanismos de ação probiótica.....	23
Figura 2 – Estrutura do pili SpaCBA.....	30
Figura 3 – Representação esquemática dos operons envolvidos na biossíntese de diferentes classes de bacteriocinas.....	34

### Capítulo 2 - Distribuição de genes relacionados a efeitos probióticos em *Lacticaseibacillus rhamnosus* revelada pela estrutura de população

Figura 1 - Dendrograma radial da distância genômica de mash inferido por <i>neighbor-joining</i> ..	47
Figura 2 - Diversidade genômica das principais espécies do gênero <i>Lacticaseibacillus</i> .....	48
Figura 3 - A estrutura de população de <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> .....	49
Figura 4 - O pan-genoma de <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> .....	50
Figura 5 - A estrutura de população e a matriz de presença e ausência do pan-genoma de <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> .....	51
Figura 6 - Distribuição do operon spaCBA-srtc1 nos filogrupos de <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> visualizada por uma árvore filogenética radial calculada pelo método de verossimilhança utilizando o cgMLST.....	52
Figura 7 - Diversidade de bacteriocinas em <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> .....	53
Figura 8 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança.....	54

### Capítulo 3 - Caracterização parcial da atividade bacteriocinogênica de *Lacticaseibacillus rhamnosus* HN001

Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% de gene <i>mutL</i> .....	72
Figura 2 - Representação esquemática da região contendo os genes <i>garQ</i> e <i>garI</i> , hibridização dos olinucleotídeos.....	74
Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% de gene <i>garQ</i> de <i>L. rhamnosus</i> HN001.....	75
Figura 4 - Alinhamento local realizado por Blastn entre os fragmentos sequenciados por Sanger obtidos por meio do primer garQFor (Query) e garQRev (Subject).....	76
Figura 5 – Teste de inibição dos SLCs de <i>L. rhamnosus</i> HN00.....	81
Figura S1 - Eletroferograma do sequenciamento de Sanger com o primer garQFor com 407 pb.....	84
Figura S2 - Eletroferograma do sequenciamento de Sanger com o primer garQRev com 408 pb.....	85

## LISTA DE TABELAS

### **Capítulo 2 - Distribuição de genes relacionados a efeitos probióticos em *Lacticaseibacillus rhamnosus* revelada pela estrutura de população**

Tabela 1 – Genomas reclassificados para *L. rhamnosus*.....46

Tabela S1 – Distribuição de *spaCBA-srtC1* em *Lacticaseibacillus rhamnosus*.....58

## LISTA DE QUADROS

### Capítulo 3 - Caracterização parcial da atividade bacteriocinogênica de *Lacticaseibacillus rhamnosus* HN001

Quadro 1 - Busca realizada por meio de Blastx online (query nucleotídica traduzida contra banco de dados de proteínas).....	77
Quadro 2 – Metadados principais sobre os treze genomas de <i>L. rhamnosus</i> que contém <i>garQI</i> .....	78
Quadro 3 - Proteínas identificadas como <i>garQ</i> , <i>garI</i> , <i>garC</i> ou <i>garD</i> por meio de blastp local.....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ANI - Identidade Média de Nucleotídeo (do inglês, Average Nucleotide Identity)
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATCC - Coleção Norte Americana de Cultura de microrganismos (do inglês, American Type Culture Collection)
- cgMLST - (do inglês, Core genome multilocus sequence typing)
- CLA - Ácido Linoleico Conjugado
- DNA - Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, Deoxyribonucleic Acid)
- FAO - Organização de Alimentos e Agricultura das Nações Unidas (do inglês, Food and Agriculture Organization)
- FDA - Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos da América (do inglês, Food and Drug Administration)
- GABA - Ácido gama-aminobutírico
- GraQ – Garvieacina Q
- GRAS – Geralmente Reconhecido Como Seguro
- HSV - Herpes-Vírus Simples (do inglês, Herpes Simplex Virus)
- IFN- $\gamma$  - interferon gama
- IL-10 - Interleucina 10
- IL1 $\beta$  - Interleucina 1 beta
- IS - Sequência de inserção
- LGG - *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG
- sIgA - Imunoglobulina A secretora
- SLC - Sobrenadante livre de células
- SNPs - Polimorfismo de nucleotídeo único (do inglês, Single Nucleotide Polymorphisms)
- TGF $\beta$  - Fator de transformação de crescimento beta
- TNF $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa
- UFC – Unidade Formadora de Colônia
- USD - Dólar Americano (do inglês United States dollar)
- wgMLST - (do inglês, Whole genome multilocus sequence typing)
- WHO - Organização Mundial da Saúde (do inglês, World Health Organization)

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
OBJETIVO GERAL .....	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>19</b>
1. OS LACTOBACILLI .....	20
2. OS PROBIÓTICOS .....	21
<b>2.1 Mecanismos moleculares de efeitos probióticos em lactobacilli</b> .....	<b>22</b>
3. <i>LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS</i> .....	26
<b>3.1 Pili e principais adesinas intestinais de <i>L. rhamnosus</i></b> .....	<b>28</b>
4. BACTERIOCINAS .....	31
<b>4.1 Organização dos genes biossintéticos de bacteriocinas</b> .....	<b>33</b>
<b>4.2 Aplicações de bacteriocinas em alimentos</b> .....	<b>36</b>
<b>4.3 Bacteriocinas em <i>L. rhamnosus</i></b> .....	<b>37</b>
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>40</b>
DISTRIBUIÇÃO DE GENES RELACIONADOS A EFEITOS PROBIÓTICOS EM <i>LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS</i> REVELADA PELA ESTRUTURA DE POPULAÇÃO .	40
1. INTRODUÇÃO .....	41
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	43
<b>2.1 Obtenção e curagem dos genomas</b> .....	<b>43</b>
<b>2.2 Filtragem de qualidade dos genomas de <i>Lacticaseibacillus</i></b> .....	<b>43</b>
<b>2.3 Obtenção do <i>core</i> MLST e inferência da estrutura de população de <i>L. rhamnosus</i></b> .....	<b>44</b>
<b>2.4 Determinação do pan-genoma de <i>L. rhamnosus</i> e análises de genomas completos de         cada filogrupo</b> .....	<b>44</b>
<b>2.5 Distribuição de genes associados aos efeitos probióticos nos filogrupos de <i>L. rhamnosus</i></b> .....	<b>45</b>
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	45
4. CONCLUSÕES .....	57
<b>CAPÍTULO III</b> .....	<b>63</b>

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA ATIVIDADE BACTERIOCINOGÊNICA DE <i>LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS</i> HN001 .....	63
<b>RESUMO</b> .....	64
1. INTRODUÇÃO .....	64
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	67
<b>2.1 Cepas e condições de cultivo e armazenamento</b> .....	<b>67</b>
<b>2.2 Extração de DNA</b> .....	<b>68</b>
2.3 Confirmação da espécie por PCR.....	68
2.4. Pesquisa genética do operon <i>garQI</i> .....	69
2.4.1. Desenho dos oligonucleotídeos específicos para o gene <i>garQ</i> e PCR .....	69
2.4.2. Purificação e sequenciamento dos produtos de PCR .....	69
<b>2.5 Obtenção do sobrenadante livre de células de <i>L. rhamnosus</i> HN001</b> .....	<b>70</b>
<b>2.6 Verificação da atividade de inibição do SLC de <i>L. rhamnosus</i> HN001</b> .....	<b>70</b>
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	71
<b>3.1 Confirmação da espécie <i>L. rhamnosus</i></b> .....	<b>71</b>
<b>3.2 Pesquisa genética de bacteriocina GarQ</b> .....	<b>73</b>
<b>3.3 Verificação da atividade de inibição do sobrenadante livre de células de <i>L. rhamnosus</i>     HN001</b> .....	<b>79</b>
4. CONCLUSÕES .....	83
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	86
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>87</b>
<b>ANEXO 1 – ARTIGO PUBLICADO</b> .....	<b>103</b>
<b>ANEXO 2 – SUBMISSÃO DO ARTIGO DO CAPÍTULO III</b> .....	<b>104</b>

## INTRODUÇÃO

*Lacticaseibacillus rhamnosus* é uma bactéria Gram-positiva amplamente caracterizada como probiótica, possuindo muitas cepas consideradas seguras devido ao status de “Geralmente Reconhecido como Seguro” (GRAS) emitido pela FDA dos EUA (Zhao *et al.*, 2023). Isto se deve aos extensos relatos de efeitos benéficos para a saúde humana derivados da sua utilização, como na prevenção da disbiose vaginal (Pino *et al.*, 2021), atenuação da colite ulcerativa (Liu *et al.*, 2020), bem como dos frequentes isolamentos de cepas de *L. rhamnosus* de partes do corpo humano, como por exemplo, do intestino humano (Chen *et al.*, 2023) ou do trato urogenital e cavidade oral (Chervinets *et al.*, 2018; Petrova *et al.*, 2018).

Desde a descrição do *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) em 1989, um vasto número de cepas foi descrito como potencialmente probióticas (Capurso 2019). Cepas não LGG como, *L. rhamnosus* Lcr35 (Nivoliez *et al.*, 2012), *L. rhamnosus* MTCC-5897 (Bhat *et al.*, 2019, 2020), e *L. rhamnosus* LOCK900 (Aleksandrzak-Piekarczyk *et al.*, 2013), são classificadas como potenciais probióticos devido a capacidade de adesão demonstrada em testes com culturas de células ou experimentos com camundongos. Apesar desses resultados comuns às várias cepas, estudos clínicos utilizando a administração de probióticos de forma controlada delinearam o paradigma de que os efeitos benéficos de probióticos bacterianos são cepa-específico (Johnson *et al.*, 2014). Este cenário, em conjunto com a recente reclassificação do gênero *Lactobacillus*, utilizando genômica comparativa, e a subsequente criação do gênero *Lacticaseibacillus* (Zheng *et al.*, 2020), possibilita o desenvolvimento de estudos de genômica comparativa em *L. rhamnosus*.

Recentemente foi observado um aumento da quantidade de genomas disponibilizados em bases de dados públicas, em consequência direta da popularização do sequenciamento genômico de bactérias. O acúmulo de genomas de cepas de *L. rhamnosus* evidenciou características genômicas distintas, como número de genes e presença ou ausência de genes codificantes de adesinas (Ceapa *et al.*, 2015). Em contrapartida, a identificação de genes que codificam proteínas diretamente envolvidas nos processos probióticos, não é uma tarefa simples, devido aos intrincados mecanismos desencadeados pela introdução de uma população bacteriana exógena viva na microbiota intestinal (revisto por Lebeer *et al.* 2018).

De toda maneira, a adesão às células alvos do hospedeiro é considerada um dos poucos traços probióticos unânimes que um potencial probiótico bacteriano deve possuir. Em *L.*

*rhamnosus* a adesina Spa possui duas formas, codificadas pelos operons *spaCBA-srtC1* e *spaFED-srtC2*, sendo a primeira mais diretamente relacionada aos efeitos probióticos, pois já foi demonstrado seu papel essencial na capacidade de promover a adesão *in vitro* de *L. rhamnosus* GG (LGG) às células do epitélio intestinal (Lebeer *et al.*, 2012), assim como ligar-se à  $\beta$ -lactoglobulina do leite (Guerin *et al.*, 2018). Adicionalmente, Douillard *et al.* (2014) demonstraram a alta conservação de dois tipos de motivo LPXTG nas proteínas SpaCBA em diferentes espécies de bactérias Gram-positivas, incluindo *L. rhamnosus* (Douillard *et al.*, 2014).

As bacteriocinas são um grupo diverso de peptídeos ou proteínas bioativas, estáveis ao calor, sintetizados ribossomalmente por bactérias imunes às suas próprias bacteriocinas, devido à produção de uma proteína de imunidade específica (Hegarty *et al.*, 2016). Em *L. rhamnosus*, foi demonstrada a síntese de bacteriocinas, como a rhamnosina A da cepa 68 de *L. rhamnosus* (Dimitrijević *et al.*, 2009), a bacteriocina 1.0320 de *L. rhamnosus* 1.0320 (Xu *et al.*, 2021), além de bacteriocinas com atividade antibiofilme mesmo em baixas concentrações (Chen *et al.*, 2023; Ibarra-Martínez *et al.*, 2022). Além disso, ensaios *in vitro* demonstraram que bacteriocinas produzidas por *L. rhamnosus* podem impedir o crescimento de *Escherichia coli* (Zhao *et al.*, 2020) ou até mesmo inibir uma ampla gama de patógenos de origem alimentar (Chen *et al.*, 2023; Tkhruni *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2021). Muitas cepas pertencentes à *L. rhamnosus* foram sequenciadas e descritas como produtoras de bacteriocinas (Oliveira *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2021), indicando que o potencial genômico para competir com outras bactérias via produção de bacteriocinas, pode estar presente em várias cepas de *L. rhamnosus*, independente da fonte de isolamento.

A genômica microbiana de populações utiliza dados de sequenciamento genômico do maior número possível de indivíduos da mesma espécie para monitoramento, estudo ou controle de populações bacterianas (Sheppard *et al.*, 2018). Com o auxílio dessa abordagem a estrutura de população da espécie *L. rhamnosus* foi elucidada e utilizada para mapear a distribuição de genes relacionados aos efeitos probióticos neste trabalho. Além disso, foi encontrado em *L. rhamnosus* uma bacteriocina da classe IId, denominada Garvieacina Q que, até o momento, ainda não havia sido descrita dentro do gênero cuja a espécie pertence (Dutra-Silva *et al.*, 2021). Também foi confirmada a presença de um operon contendo os genes *garQI*, responsáveis pela síntese da bacteriocina Garvieacina Q em *L. rhamnosus* HN001, onde o operon encontra-se conservado.



Assim, o presente trabalho teve como objetivos: investigar todos os genomas disponíveis publicamente dos gêneros *Lactobacillus* e *Lacticaseibacillus* para estudar o pangenoma e a estrutura geral da população de *L. rhamnosus*, com intuito de elucidar a distribuição de genes associados a alguns efeitos benéficos da espécie, além de investigar aspectos moleculares e fisiológicos relativos à ocorrência, conservação, produção, secreção e atividade de Garvieacina Q em *L. rhamnosus* HN001.

No Capítulo I, é exposto o referencial teórico com os principais temas utilizados para a realização desse estudo. O Capítulo II contempla o artigo intitulado: Distribuição de genes relacionados a efeitos probióticos em *Lacticaseibacillus rhamnosus* revelada pela estrutura de população, publicado na revista Probiotics and Antimicrobial Proteins. E no Capítulo III apresenta o artigo intitulado: Caracterização parcial da atividade bacteriocinogênica de *Lacticaseibacillus rhamnosus* HN001, submetido para revisão na revista Journal of Applied Microbiology. Posteriormente, são apresentadas as considerações finais sobre os resultados obtidos nos capítulos II e III e possíveis perspectivas para estudos futuros.

## OBJETIVO GERAL

Estudar a distribuição de genes associados a efeitos benéficos em *Lactocaseibacillus rhamnosus*, com ênfase nos genes codificadores da bacteriocina Garvieacina Q e na capacidade bacteriocinogênica de *L. rhamnosus* HN001.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer a estrutura de população através de um método filogenético robusto.
- Obter o pan-genoma e traçar inferências a partir deste.
- Estabelecer quantitativamente a abundância dos genes benéficos (adesinas e bacteriocinas) em *L. rhamnosus*.
- Correlacionar os genes benéficos nos filogrupos.
- Caracterizar filogrupos mais promissores para prospecção de isolados com potencial probiótico. Adquirir e testar cepas potencialmente produtoras de bacteriocinas de interesse quanto a sua capacidade de inibir patógenos e confirmar sua taxonomia.
- Confirmar a presença dos genes *garQ* e *garI* em *L. rhamnosus* HN001 por meio de abordagens moleculares.
- Obter evidências que suportem a capacidade de inibição de agentes patogênicos por *L. rhamnosus* HN001.
- Confirmar a natureza proteica do possível peptídeo antimicrobiano secretado, através de ensaio de inibição *in vitro*.
- Realizar a caracterização parcial da bacteriocina de interesse.

## **CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 1. OS LACTOBACILLI

A primeira descrição do gênero *Lactobacillus* se remete ao ano de 1901 realizada pelo microbiologista Martinus W. Beijerinck (Beijerinck, 1901). A partir desta data, uma proposta inicial de organização sistemática deste gênero foi introduzida, baseada na classificação das espécies bacterianas de acordo com suas características fenotípicas, levando-se em consideração as vias de fermentação de carboidratos, produção de metabólitos, bem como a temperatura de crescimento ideal do lactobacilo estudado (Orla-Jensen, 1919). Em decorrência do acúmulo de dados genômicos de cepas das diferentes espécies de *Lactobacillus*, este gênero foi reclassificado em 25 novos gêneros, incluindo o próprio *Lactobacillus* (Zheng *et al.*, 2020).

No âmbito da nova taxonomia proposta, *Lactobacillus* caracteriza-se como um grupo heterogêneo, compreendendo, atualmente, 38 espécies, incluindo todo o grupo *L. delbrueckii* e suas seis subespécies. Zheng e colaboradores (2020) também criaram o gênero *Lacticaseibacillus*, abrangendo 17 espécies, incluindo algumas de interesse comercial como *L. casei*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus*. Apesar dessas distinções, o termo *lactobacilli* permanece em uso para se referir ao conjunto de organismos anteriormente classificados como *Lactobacillus*.

Os *lactobacilli* pertencem ao filo *Firmicutes*, agrupando mais de 260 espécies bacterianas Gram-positivas, catalase negativa, não esporulantes, podendo ser anaeróbicas ou aerotolerantes (Zheng *et al.*, 2020). Geralmente, apresentam metabolismo fermentativo, capazes de produzir rapidamente ácido lático como produto final do metabolismo de carboidratos (Klaenhammer *et al.*, 2011). Estas bactérias estão distribuídas em uma ampla gama de nichos ambientais incluindo plantas, matérias-primas utilizadas na produção de alimentos e na microbiota autóctone do trato gastrointestinal humano e animal (Duar *et al.*, 2017).

Desde sua caracterização, a eficiência desses microrganismos na produção de ácido lático justificou seu emprego na produção de alimentos fermentados, obtidos pela transformação de matérias-primas perecíveis de origem animal ou vegetal em produtos com maior grau de conservação e melhores aspectos sensoriais (Rossi *et al.*, 2019). Como resultado da sua antiga utilização na prática fermentativa, essas bactérias se tornaram industrialmente importantes sendo aplicadas, atualmente, em áreas biotecnológicas, terapêuticas, em fermentações agrícolas e de alimentos, constituindo culturas *starter* e ou culturas protetoras em vegetais fermentados, laticínios e produtos cárneos (Abriouel *et al.*, 2015). Outra aplicação

promissora destas bactérias é no segmento de produtos probióticos, que trazem benefícios à saúde humana.

## 2. OS PROBIÓTICOS

A denominação probiótico se refere à microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002; Hill *et al.*, 2014). Diversos organismos como *Bifidobacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Bacillus* spp., os *lactobacilli* e até leveduras como *Saccharomyces* spp., também possuem espécies classificadas como probióticos (Fredua *et al.*, 2017), e têm sido associados a efeitos benéficos à saúde de seu hospedeiro, além de possuírem histórico de uso seguro.

Parâmetros específicos de segurança, funcionalidades e tecnológicos são necessários para selecionar e classificar um microrganismo como probiótico. Assim, as cepas bacterianas devem tolerar altas concentrações de ácidos estomacais e sais biliares, não apresentar patogenicidade, ser incapazes de transferir resistência a antibióticos e ter capacidade de aderir às células epiteliais do intestino. Além disso, as cepas devem apresentar estabilidade genotípica e fenotípica e desejavelmente produzir substâncias antimicrobianas às bactérias patogênicas (Da Silva Ferrari *et al.*, 2016; Yadav *et al.*, 2017)

Os microrganismos probióticos não colonizam permanentemente o epitélio intestinal devido à processos multifatoriais, tais como: exclusão competitiva entre espécies relacionadas, resistência apresentada pelo microbioma do hospedeiro com resposta imune individualizada às cepas probióticas e suas características de adesão (Zmora *et al.*, 2018). Para tal, os probióticos precisam sobreviver a passagem pelo trato digestivo superior humano, para que cheguem viáveis e em quantidade suficiente no intestino, onde poderão desempenhar suas funções antes de serem eliminados. Nesse sentido, o conteúdo recomendado de células viáveis de probióticos na porção do alimento é de  $10^9$  UFC/porção diária de consumo até o final da vida útil do produto, nas condições de armazenamento especificadas, com incerteza de 0,5 log de produto considerado probiótico (FAO/WHO, 2018), ao passo que a legislação brasileira deixa à cargo do requerente a comprovação da quantidade mínima do microrganismo probiótico em UFC/dia adequado para obtenção da resposta funcional desejada (ANVISA, 2021).

Ainda no que tange a regulação dos probióticos, estes precisam ter sua segurança e eficácia atestada, para tanto é necessário garantir que esses contenham os organismos efetores

viáveis e em número suficiente no momento do consumo. As cepas selecionadas devem suportar o processo produtivo em escala industrial, bem como demonstrar a habilidade de sobreviver e manter sua viabilidade ao longo da produção e estocagem (Min *et al.*, 2019).

Apesar dos desafios envolvidos em sua cadeia produtiva, o mercado de alimentos probióticos se mostra em crescimento, principalmente devido à demanda por consumo de alimentos funcionais (Min *et al.*, 2019). A maior parte dos produtos probióticos são comercializados na forma de derivados lácteos, porém o aumento do vegetarianismo, o crescente número de indivíduos intolerantes à lactose, além de fatores econômicos e culturais podem limitar o consumo desses produtos (Panghal *et al.*, 2018). Sendo assim, há um futuro promissor no desenvolvimento de novos alimentos probióticos derivados de outras matrizes alimentícias como: cereais, vegetais e frutas (Aspri *et al.*, 2020).

O mercado global de probióticos prevê atingir um crescimento para o valor de USD 64 bilhões até o ano de 2022 (Salveti *et al.*, 2018). Neste cenário, os estudos científicos sobre aspectos genômicos, biotecnológicos e sobre os benefícios proporcionados por estes microrganismos, em conjunto com documentações que atestem a segurança do uso de probióticos em alimentos, vêm crescentemente contribuindo com informações robustas que impulsionam este segmento de mercado.

Atualmente, não há um conjunto homogêneo de efeitos probióticos nos vários produtos disponíveis, ademais estes efeitos são frequentemente vinculados de forma específica à espécie ou mesmo à cepa consumida (Plaza-Diaz *et al.*, 2019). Contudo, existem estudos sobre microrganismos probióticos para várias aplicações, como na modulação da atividade anti-inflamatória e da microbiota endógena intestinal, no estímulo do sistema imunológico, bem como na exclusão competitiva de patógenos e na síntese de substâncias antimicrobianas, além de efeitos benéficos na função cerebral e na redução de alergias alimentares (Roobab *et al.*, 2020). Essa ampla literatura científica tornou possível a pesquisa e o desenvolvimento de produtos probióticos à base de diferentes microrganismos e ao longo do tempo, consolidou o grupo lactobacilli como os principais representantes dentre os probióticos estudados e utilizados nas formulações alimentares (Oh *et al.*, 2018).

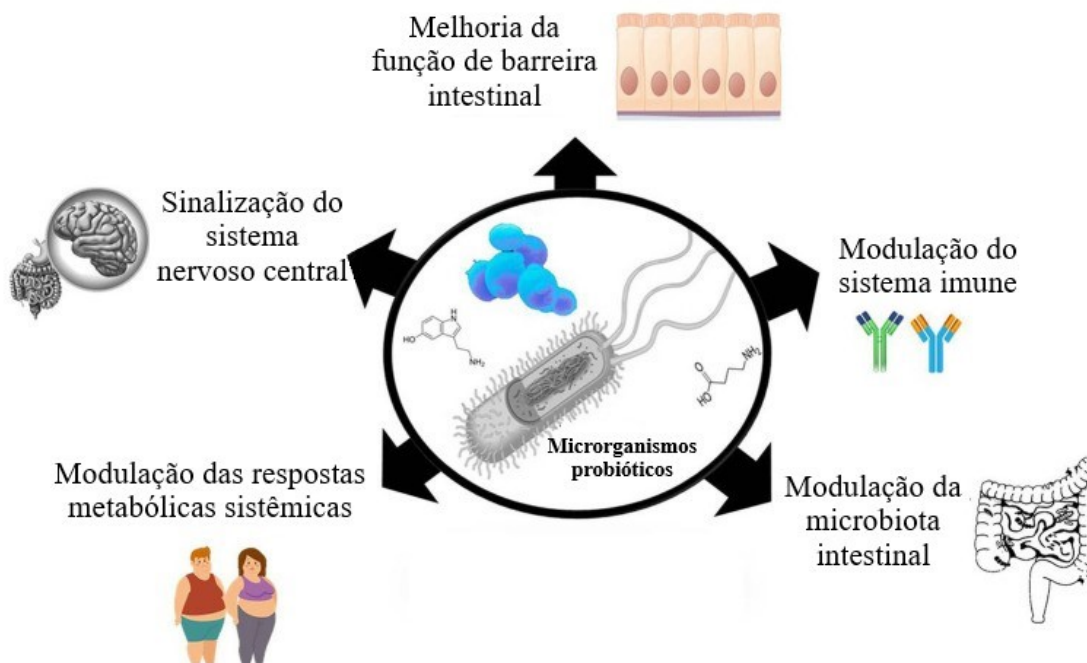
## **2.1 Mecanismos moleculares de efeitos probióticos em lactobacilli**

A crescente difusão das metodologias moleculares, fundamentais na pesquisa acerca dos mecanismos subjacentes da ação probiótica, trouxeram à luz o conhecimento sobre as

moléculas efetoras que medeiam tais mecanismos complexos. O termo moléculas efetoras probióticas se refere às moléculas produzidas por organismos probióticos que contribuem para a promoção da saúde do hospedeiro, através de diversos modos de ação específicos das cepas (Morovic *et al.*, 2021).

Vários mecanismos de ação probiótica de lactobacilli foram postulados como responsáveis pelo papel benéfico desempenhado pelo microrganismo, a partir da premissa existente das interações bioquímicas estabelecidas entre o probiótico e a célula hospedeira (Singh *et al.*, 2018). Em uma revisão, Daliri *et al.* (2021) explora a discussão sobre alguns mecanismos de ação probiótica conhecidos e não totalmente elucidados, procurando aclarar as potencialidades decorrentes das interações bioquímicas discutidas, como a melhoria das funções da barreira do epitélio intestinal, modulação do sistema imunológico, da microbiota intestinal e das respostas metabólicas sistêmicas, assim como da sinalização do sistema nervoso central (Figura 1).

Figura 1 – Mecanismos de ação probiótica.



Fonte: Adaptado de Daliri *et al.* (2021).

Os tipos de molécula efetora probiótica podem ser divididos em moléculas solúveis, que seriam produtos ou subprodutos metabólicos secretados pelo microrganismo produtor, ou

moléculas associadas à parede celular (Delgado *et al.*, 2020). Assim, estas moléculas afetam os mecanismos de ação probiótica participando das sinalizações moleculares.

A regulação da resposta imune do hospedeiro é alcançada por meio de dois processos principais: i) adesão entre a cepa probiótica e as células epiteliais do intestino e ii) reconhecimento de moléculas solúveis com funções imunomodulatórias, produzidas pelo microrganismo probiótico ou associadas à sua parede celular. No primeiro processo, a interação dos probióticos com as células epiteliais por adesão é capaz de estimular uma cascata de sinalização, resultando na modulação da resposta imune de forma direta. Alternativamente, no segundo processo, as moléculas solúveis liberadas ou associadas à parede celular, as quais são reconhecidas por receptores específicos das células intestinais do hospedeiro, podem resultar na ativação direta ou indireta das células do sistema imunológico (Kumari *et al.*, 2020).

Os efeitos imunomodulatórios desempenhados pelos probióticos no organismo hospedeiro se expressam no intestino pelo aumento da quantidade de leucócitos intra-epiteliais e células caliciformes, estímulo da produção de componentes pró-inflamatórios para respostas contra patógenos e sustentação da integridade da mucosa, como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) e interleucina 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ), além das citocinas regulatórias do tipo fator de transformação de crescimento  $\beta$  (TGF $\beta$ ) e interleucina 10 (IL-10). A atividade de macrófagos, linfócitos e a estimulação da produção de interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) são aumentadas mediante a administração de probióticos específicos, auxiliando na regulação imunológica (Kwoji *et al.*, 2021). Outros meios adicionais de imunomodulação são o aumento da expressão de mucina nas células intestinais e a regulação das junções oclusivas dificultando a penetração de patógenos (Oak; Jha, 2019).

O estabelecimento da barreira epitelial intestinal é de suma importância para a homeostase intestinal normal e para a prevenção de possíveis inflamações e infecções causadas por patógenos (Soroosh *et al.*, 2019). Esta rede de proteínas, que envolve as células epiteliais do intestino formando uma barreira protetora, é mantida por proteínas de junções oclusivas, como claudinas, ocludinas e zônula ocludente. Estudos mostram que alguns probióticos são conhecidos por produzirem ácido linoléico conjugado (CLA) que regula positivamente a transcrição de E-caderina 1, claudina-3, zônula ocludente e ocludina em intestino, protegendo as funções de barreira intestinal (Wang *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2019). Além disso, o estímulo à produção de mucina nas células intestinais do hospedeiro, aumenta as funções de barreira do epitélio intestinal, como no caso de *L. rhamnosus* GG que apresentou capacidade de aumento



da expressão de mucina em células intestinais, além de promover a expressão de ocludina e zônula ocludente (Gao *et al.*, 2019). Este mecanismo inclui a diminuição da permeabilidade, promovendo a funcionalidade das junções oclusivas e melhora da função imune inata.

Respostas metabólicas sistêmicas podem ser induzidas de forma geral pelo consumo de probióticos, ou de forma específica através de uma cepa probiótica particular, promovendo, por exemplo, atividade de hidrolases de sais biliares impactando nos hormônios da saciedade e modulações endócrinas (Lebeer *et al.*, 2018).

A suplementação com probióticos tem sido utilizada como possível estratégia para contribuir na melhora do metabolismo lipídico (Daliri *et al.*, 2021). Pacientes que possuem distúrbios metabólicos como hipercolesterolemia, ou doença hepática gordurosa não alcoólica, também incluída como componente da síndrome metabólica, buscam através do consumo de cepas probióticas específicas mitigar os efeitos indesejáveis relacionados aos altos níveis de colesterol (Wang *et al.*, 2020). Neste sentido, uma hipótese de maior destaque a respeito do mecanismo pelo qual os probióticos reduzem o colesterol em nível molecular no hospedeiro, é a capacidade destas cepas específicas de produzirem hidrolases de sais biliares que promovem a desconjugação dos sais biliares possibilitando o catabolismo do colesterol sanguíneo, resultando em moléculas menos solúveis e, portanto, menos reabsorvidas na circulação, sendo então excretadas nas fezes (Wang *et al.*, 2019).

A comunicação existente entre a microbiota intestinal e o sistema nervoso central é outro mecanismo de ação probiótica amplamente estudado. Na maioria dos trabalhos são administradas espécies probióticas de lactobacilli e bifidobactérias aos indivíduos, uma vez que se acredita que os probióticos contribuam no equilíbrio da diversidade intestinal, suprimindo patógenos e interagindo com a microbiota do hospedeiro, consequentemente apresentando efeitos, não apenas na resposta imune, como também sobre o metabolismo e função hormonal (Mörkl *et al.*, 2020). Embora os mecanismos pressupostos aos efeitos dos probióticos sobre o sistema nervoso central não sejam claramente compreendidos, há evidências que tais mecanismos sejam multifatoriais, envolvendo demais sistemas, como também ocorram principalmente através da produção de metabólitos bacterianos (Ong *et al.*, 2018). Muitas bactérias probióticas produzem ácidos graxos de cadeia curta que alteram a excitabilidade neural, além de compostos neuroativos, incluindo dopamina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), histamina, acetilcolina e triptofano, que é um precursor na biossíntese da serotonina (Plaza-Diaz *et al.*, 2019).

Outro mecanismo de ação dos probióticos proposto é a modulação da microbiota intestinal, a qual é evidenciada pela alteração da população bacteriana benéfica, da função de barreira do epitélio intestinal e da produção de citocinas (Azad *et al.*, 2018). Alguns trabalhos relatam que os probióticos aumentam a função de barreira através do estímulo da produção de imunoglobulina A secretora (sIgA), que protege o epitélio contra a colonização e ou invasão pela ligação e neutralização de antígenos virais ou bacterianos durante a transcitose do epitélio e que a interação com células imunes também resulta na produção de citocinas específicas (Plaza-Diaz *et al.*, 2019; Wan *et al.*, 2019). De modo geral, os mecanismos probióticos direcionados à modulação da microbiota intestinal incluem a atividade antimicrobiana proporcionada pela produção, por exemplo, de ácido láctico ou bacteriocinas, competição por nutrientes e alteração do metaboloma intestinal (Lebeer *et al.*, 2018).

Para qualquer um desses mecanismos probióticos a adesão à célula epitelial intestinal do hospedeiro é um traço fundamental, uma vez que estabelecida esta ligação a colonização e formação de biofilme se iniciam, permitindo a entrega eficiente de moléculas efetoras probióticas, tais como bacteriocinas capazes de suprimirem o crescimento de bactérias patogênicas invasoras (Lebeer *et al.*, 2012).

### 3. *LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS*

Inicialmente considerada uma subespécie de *Lactobacillus casei*, o *Lactobacillus rhamnosus*, atualmente reclassificado como *Lacticaseibacillus rhamnosus*, é um microrganismo Gram-positivo, anaeróbio facultativo ou microaerófilo, não esporulante, sem motilidade, catalase negativa, heterofermentativo facultativo, que possui forma de bastonetes e geralmente se apresentam associados em cadeia (Papizadeh *et al.*, 2016; Byl *et al.*, 2020). Pertence aos microrganismos mesófilos e dependendo da cepa, suas culturas podem crescer em temperaturas inferiores a 15° C ou superiores a 40° C, com faixa de pH ideal para seu crescimento de 4,5 a 6,4 (Carr *et al.*, 2002; Liptáková *et al.*, 2008). A espécie detém um elevado número de cepas com perfis genéticos, metabólicos e regulatórios diversos que explicam sua presença versátil em diferentes nichos ambientais, desde a microbiota animal a produtos alimentícios (Ceapa *et al.*, 2016).

Dentre as várias cepas de *L. rhamnosus*, a LGG é amplamente estudada e documentada em seus aspectos fisiológicos e de aplicações na saúde (Hill *et al.*, 2018). Ensaios laboratoriais indicam que a cepa LGG demonstra alta tolerância as condições ácidas estomacais,

sobrevivência a passagem intestinal, além de capacidade de adesão robusta à mucosa superficial do intestino e colonização do trato gastrointestinal após poucos dias de tratamento (Liptáková *et al.*, 2008). Seus benefícios probióticos variam desde a prevenção de diarreia associada a antibióticos em crianças e adultos (Guandalini *et al.*, 2011; Guarino *et al.*, 2015; Szajewska *et al.*, 2015), a doenças tóxicas (Kalliomäki *et al.*, 2001; Spacova *et al.*, 2020), até na redução de sintomas de infecções do trato urinário (Tractenberg *et al.*, 2020; Petrova *et al.*, 2021). Assim, a cepa probiótica LGG é comercializada mundialmente desde os anos 90 como suplemento dietético, ingrediente alimentar e como cultura protetora em alimentos lácteos fermentados e não-fermentados (Capurso, 2019).

Desde 1989, quando LGG foi patenteada tornando-se a primeira cepa pertencente ao gênero *Lactobacillus* descrita em patente, o número de trabalhos descrevendo demais cepas não LGG potencialmente probióticas aumentou (Capurso, 2019). O acréscimo na quantidade de cepas classificadas como probióticas potenciais se deu graças à capacidade destas bactérias de resistirem a ambientes com altas concentrações de ácido e sais biliares, de aderirem à cultura de células epiteliais intestinais e por suas propriedades tecnológicas e potencialmente promotoras da saúde (Ceapa *et al.*, 2015). Neste sentido, Papizadeh *et al.* (2016) destacaram as cepas ATCC 53103 (GG - Gorbach-Goldwin), GR-1, HN001 (DR20), LB21 e 271 da espécie *L. rhamnosus*, como os principais probióticos estudados.

O modo de ação probiótico exercido pela espécie ainda não foi totalmente elucidado, embora existam numerosos trabalhos reportando os benefícios à saúde humana associados ao consumo de *L. rhamnosus*. Vários processos agem independentemente ou associados, mas majoritariamente a eficiência do modo de ação está relacionada à cepa bacteriana. Nesta perspectiva, existem alguns modos de ação probióticos mais frequentemente observados em cepas de *L. rhamnosus*, como a capacidade de inibição do crescimento de patógenos por meio do ácido lático, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas produzidas, além de intervenção na colonização de patógenos pela atividade de biosurfactantes (Petrova *et al.*, 2021).

*L. rhamnosus* possui diferentes cepas isoladas de partes do corpo humano distintas, obtidas, por exemplo, do trato intestinal (Kant *et al.*, 2014), de cavidade vaginal (Pascual *et al.*, 2008; Chenoll *et al.*, 2016; Petrova *et al.*, 2018) cavidade oral (Chervinets *et al.*, 2018), de nasofaringe humana (De Boeck *et al.*, 2020), além do próprio sangue (Nissilä *et al.*, 2017), saliva (Richard *et al.*, 2001), fezes (Kant *et al.*, 2014) e urina (Karlsson *et al.*, 2012) de pessoas com diferentes faixas etárias, saudáveis ou não. Interessantemente também, *L. rhamnosus* é

considerada integrante comum do microbioma do trato gênito-urinário feminino (Papizadeh *et al.*, 2016). Isto demonstra a estreita relação desta espécie com o corpo humano.

A presença frequente de cepas de *L. rhamnosus* no trato gastrointestinal humano tem motivado estudos sobre a adaptabilidade e as interações desta espécie sobre este nicho (Morita *et al.*; 2009). Algumas capacidades funcionais atribuídas às cepas específicas de *L. rhamnosus* são correlacionadas com o nicho preferido por elas. Diferentes trabalhos abordam a ocorrência de genes codificadores de *pili* para adesão intestinal, denominados *spaCBA-srtCI*, os quais seriam elementos cruciais na adesão ao muco intestinal humano e às células epiteliais intestinais (Lebeer *et al.*; 2012; Petrova *et al.*, 2018). A produção extracelular de polissacarídeos ricos em ramnose e galactose, também é reconhecida como fator importante na adaptação da espécie no trato intestinal, conferindo proteção contra fatores imunes inatos no intestino.

A compreensão da biologia de *L. rhamnosus* se acelerou com os avanços propiciados pelo sequenciamento de segunda geração, outrora denominado sequenciamento de nova geração. LGG é a cepa mais estudada da espécie e possui quatro *assemblies* distintos depositados no banco de dados RefSeq, inclusive muitos dos avanços na compreensão dos efeitos probióticos derivam de estudos com esta cepa (Capurso, 2019). O acúmulo de genomas de outras cepas de *L. rhamnosus* evidenciou características genômicas distintas, como número de genes e presença ou ausência de genes codificantes de adesinas (Ceapa *et al.*, 2015).

Uma consequência direta da popularização do sequenciamento genômico de bactérias é o aumento da quantidade de genomas disponibilizados em bases de dados públicas, contribuindo para o surgimento de pesquisas relacionadas à genômica microbiana. Variações gênicas intra- e inter-espécie puderam ser analisadas a partir de comparações filogenéticas e inferências evolutivas que acarretaram na atualização da classificação taxonômica de grupos complexos tais como o gênero *Lactobacillus* e a criação do gênero *Lacticaseibacillus* (Zheng *et al.*, 2020). Assim, a genômica comparativa é uma ferramenta útil para estudar espécies de interesse no âmbito da microbiologia de alimentos.

### **3.1 *Pili* e principais adesinas intestinais de *L. rhamnosus***

A capacidade de adesão do microrganismo probiótico é um fator importante no que diz respeito as interações com as células do hospedeiro e conseqüentemente ao potencial benéfico que este microrganismo pode desempenhar na saúde do consumidor (Lebeer *et al.* 2010). Adesinas presentes na parede celular da cepa probiótica também são fundamentais na

colonização em termos de interação com o hospedeiro, sinalização e formação de biofilme. Estes complexos proteicos reconhecem e se ligam a receptores também de natureza proteica na camada superficial da célula alvo do hospedeiro promovendo a adesão (Douillard *et al.*, 2014).

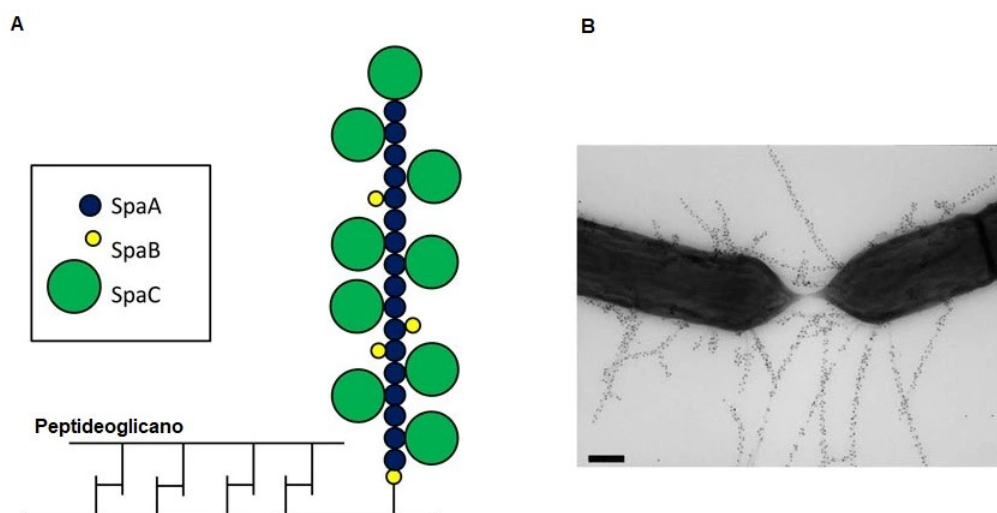
Um grupo importante de adesinas denominado *pili* são projeções proteicas longas e finas da superfície celular, presentes em uma variedade de bactérias que colonizam nichos associados a mucosa (Monteagudo-Mera *et al.*, 2019). Os *pili* bacterianos foram descobertos há mais de 50 anos, inicialmente em bactérias Gram-negativas e posteriormente em bactérias Gram-positivas, ambos através de microscopia eletrônica (Duguid *et al.*, 1956; Yanagawa *et al.*, 1968). Essas estruturas proteicas possuem organização estrutural diversa e, por isso, exibem diferentes tipos encontrados apenas em bactérias Gram-negativas, como o Chaperone *usher*, e outros como *pili* dependente de sortase em bactérias Gram-positivas (Dos Santos Moraes *et al.*, 2020). Nas diferentes bactérias os *pili* estão envolvidos no processo de adesão, como mediadores das interações que ocorrem entre a bactéria e célula hospedeira ou superfícies ambientais, ou ainda, com outras bactérias. Por conseguinte, estas estruturas são importantes nos processos subsequentes de colonização, formação de biofilme e nos eventos de sinalizações (Kline *et al.*, 2010).

Os *pili* dependentes de sortase, expressos em organismos Gram-positivos, apresentam esse nome em alusão à enzima transmembrana que catalisa a reação de polimerização da estrutura do *pili*, esta estrutura é composta por subunidades polimerizadas de pilina covalentemente ligadas umas às outras por uma série de reações de transpeptidação mediadas por sortase (Hendrickx *et al.*, 2011). Os *pili* dependentes de sortase, até então considerados exclusivos de bactérias patogênicas, foram observados através de microscopia eletrônica de transmissão na bactéria probiótica não patogênica *L. rhamnosus* GG, sendo caracterizado por meio de análise comparativa do genoma (Kankainen *et al.*, 2009).

Alguns lactobacilli, incluindo os *L. rhamnosus*, podem expressar um tipo de *pilus* dependente de sortase, nomeados SpaCBA, o qual é constituído pelas três proteínas pilinas SpaA, SpaB e SpaC, além de uma sortase SrtC1 específica de pilina que liga todos os três monômeros covalentemente (Figura 2) e são codificados pelo cluster de genes *spaCBA-srtC1* (Reunanen *et al.*, 2012). A subunidade SpaA se refere ao componente do eixo principal da fibra do *pilus* e confere função estrutural, a subunidade secundária menor, SpaB, se refere à subunidade basal para ancoragem e está ligada à camada de peptidoglicano de forma dispersa, com função de sinalização da terminação de polimerização do *pilus*. Já a subunidade secundária

SpaC está presente na ponta e ao longo de todo comprimento do *pilus* em grande quantidade, esta quantidade e distribuição da adesina SpaC no *pilus* permite a adesão longa e estreita da bactéria com o tecido hospedeiro e auxilia na colonização a longo prazo da cepa (Hill *et al.*, 2018).

Figura 2 – Estrutura do *pili* SpaCBA.



Representação esquemática da estrutura do *pili* SpaCBA (A). Presença de *pili* SpaCBA com comprimentos de até 1µm, por imagem TEM de *L. rhamnosus* GG marcadas com anti-soro SpaA e partículas de ouro de proteína A de 10 nm. Barra de escala, 200 nm (B).

Fonte: Adaptado de Segers; Lebeer, (2014).

O *pili* SpaCBA é uma das moléculas efetoras probióticas melhor caracterizadas em *L.rhamnosus*, esta molécula associada à parede celular bacteriana demonstrou ser fundamental no processo de adesão ao muco humano e epitélio intestinal, na formação de biofilme (Lebeer *et al.*, 2012), exclusão competitiva de patógenos (Rasinkangas *et al.*, 2020), na modulação das interações imunorregulatórias com monócitos e células dendríticas (Vargas García *et al.*, 2016), além de promoverem a adesão à  $\beta$ -lactoglobulina do leite (Guerin *et al.*, 2018). Particularmente, é importante destacar que a subunidade SpaC é considerada essencial para a ligação de LGG ao muco, possivelmente devido à presença de domínios de ligação a porção C-terminal do colágeno e N-terminal do fator de von Willebrand (Rasinkangas *et al.*, 2020).

Embora o *pili* SpaCBA seja bem documentado em LGG, representando o elemento chave do fenótipo de alta colonização da cepa, eles estão ausentes, por exemplo, na cepa láctea Lc705 da mesma espécie, devido à ausência do operon *spaCBA-srtC1* (Lebeer *et al.*, 2012).

Douillard e colaboradores (2016) demonstraram por meio de estudos evolutivos que em situações livre de estresse, o fenótipo SpaCBA de *L. rhamnosus* GG é sustentado através de consecutivas gerações, contudo o estresse por cisalhamento, ou pela presença de sais biliares, podem ativar elementos de sequência de inserção (IS) resultando na exclusão de grandes segmentos cromossômicos, levando à perda do cluster gênico *spaCBA-srtCI* do *pilus* na cepa bacteriana. Esta condição desfavorece as gerações bacterianas posteriores por não apresentarem o fenótipo capaz de colonizar e persistir de forma robusta aos nichos associados à mucosa e, conseqüentemente, não promover os efeitos probióticos que a cepa poderia realizar.

Um segundo operon denominado *spaFED*, relacionado à adesão, foi identificado no genoma de cepas de *L. rhamnosus*, incluindo a cepa GG (Rintahaka *et al.*, 2014). Este operon é responsável pela expressão do *pili* dependente de sortase SpaFED, constituído também por três subunidades de pilina, SpaF localizado na ponta do *pilus*, para o processo de adesão, SpaE basal, para a fixação à parede celular e SpaD formando o eixo principal do *pilus* com função estrutural, além de possuir uma única proteína sortase SrtC2 (Megta *et al.*, 2019).

O *pili* SpaFED desempenha um papel ainda não totalmente esclarecido na adesão bacteriana ao muco intestinal (Rasinkangas *et al.*, 2020), sobretudo a subunidade SpaF, na extremidade do pilus, é potencialmente a subunidade mais efetiva quanto à propriedade adesiva para ligação ao muco (Rintahaka *et al.*, 2014). Dessa maneira, os mecanismos subsequentes de colonização do trato intestinal e, por conseguinte a obtenção dos benefícios que a cepa pode desempenhar ao hospedeiro, seriam supostas conseqüências da expressão do *pili*. Contudo, as evidências existentes sobre a presença do operon *spaFED* no genoma de diferentes bactérias (Martín *et al.*, 2019), não garantem a expressão do *pili* SpaFED funcional no microrganismo que o possui (Reunanen *et al.*, 2012). Os dados disponíveis indicam que a expressão dos genes *spaFED* parecem ser dependentes de estímulos ambientais e por isso não identificáveis em estudos *in vitro* (Megta *et al.*, 2019; Reunanen *et al.*, 2012).

#### 4. BACTERIOCINAS

As bacteriocinas consistem em um grupo diverso de peptídeos ou proteínas bioativas, estáveis ao calor, sintetizadas ribossomicamente por bactérias imunes às suas próprias bacteriocinas. Essa imunidade acontece devido à produção de uma proteína de imunidade específica pela bactéria produtora, que apresenta atividade antimicrobiana contra outras bactérias da mesma espécie ou filogeneticamente relacionadas ao produtor e podem fornecer

vantagem competitiva ao inibir ou matar as espécies competidoras (Hegarty *et al.*, 2016). Essas moléculas diferem em tamanho, estrutura, modificação pós-traducional, mecanismos de ação, espectro inibitório, mecanismos de imunidade e receptores de células-alvo. Entretanto, geralmente são catiônicas, anfifílicas, apresentando vários comprimentos de cadeias de aminoácidos (Tkhruni *et al.*, 2020).

As bacteriocinas configuram-se como agentes antimicrobianos naturais, seguros, inativados por enzimas digestivas, como as proteases, sendo capazes de exercer seus efeitos mesmo em baixas concentrações e, por estes motivos, tem atraído cada vez mais atenção como alternativa aos antibióticos e em aplicações na indústria de alimentos como aditivos alimentares microbianos, bioconservantes naturais (Tkhruni *et al.*, 2020; Woraprayote *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2021). Dois notáveis exemplos de bacteriocinas aprovadas pela FDA são a pediocina e a nisina, utilizadas em indústrias de alimentos (Xu *et al.*, 2021).

Uma classificação de bacteriocinas foi proposta inicialmente por Klaenhammer (1993), posteriormente atualizações neste modelo dividiram essas moléculas bioativas em três classes principais, classe I, tipicamente compreendem de 19 a 50 aminoácidos e sofrem modificações pós-traducionais, resultando em aminoácidos incomuns, como lantionina e  $\beta$ -metilantionina, classe II que contém pequenos peptídeos termoestáveis não modificados e classe III constituída por moléculas grandes e termolábeis (Kumariya *et al.*, 2019). Todas as classes de bacteriocinas subdividem-se em subclasses (revisto por Durasaimy *et al.*, 2020).

A classe I é formada por peptídeos com baixo peso molecular (< 10 kDa), termoestáveis, hidrofóbicos, catiônicos, e que sofrem modificações pós-traducionais enzimáticas, formando moléculas com aminoácidos incomuns e estruturas que impactam suas propriedades (Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016). A principal representante desta classe é a Nisina, uma bacteriocina produzida pela bactéria ácido láctica *Lactococcus lactis*, popularmente utilizada na indústria de alimentos por ser considerada segura pela FDA (Kirtonia *et al.*, 2021). A classe I é dividida em cinco principais subclasses, classe Ia dos lantibióticos (peptídeos contendo lantionina e  $\beta$ -metil lantionina), classe Ib ou labirintopeptinas (lantibióticos carbacíclicos contendo labirintina e labionina), classe c dos santibióticos (antibióticos contendo enxofre em carbono alfa) (Kumariya *et al.*, 2019), classe Id ou lantipeptídeos contendo motivo de ligação dedos de zinco e classe Ie ou lexapeptídeo (revisto por Sharma *et al.*, 2022).

Bacteriocinas de classe II são constituídas por peptídeos termoestáveis, não modificados enzimaticamente, de baixo peso molecular (< 10 kDa), hidrofóbicos, catiônicos e podem ser



divididas em classe IIa de bacteriocinas semelhantes às pediocinas, classe IIb das bacteriocinas contendo dois peptídeos, classe IIc de bacteriocinas circulares e classe IId de bacteriocinas lineares, não modificadas e não semelhantes à pediocina (Kumariya *et al.*, 2019). A classe III compreende bacteriocinas grandes e termolábeis, com mecanismos de ação bacteriolítico ou não lítico, subdivididas em duas classes principais IIIa ou bacteriolisinas e IIIb (Durasaimy *et al.*, 2020; Kumariya *et al.*, 2019). As informações sobre esta classe ainda permanecem não totalmente esclarecidas, entretanto alguns exemplos deste tipo de bacteriocinas são citados, como, helveticina M e J, colina e enterolisina A, produzidas por *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus helveticus*, *E. coli* e *Enterococcus faecalis*, respectivamente (Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016; Durasaimy *et al.*, 2020). Mais recentemente uma quarta classe passou a ser aceita, formada por bacteriocinas cíclicas com mais de 30 kDa, que possuem motivos não proteicos, como lipídeos e carboidratos, como as colicinas (Antoshina *et al.*, 2022).

O modo de ação das bacteriocinas, em geral, se dá pelo estabelecimento da ligação entre estas e receptores de superfície das células bacterianas ou, ainda, pela invasão do interior celular e interação com a membrana celular. Além disso, as bacteriocinas atuam através da formação de poros nas células-alvo, causando degradação do DNA celular e inibição da biossíntese do componente peptidoglicano da parede celular bacteriana (Daliri *et al.*, 2021; Kwoji *et al.*, 2021). Ademais, algumas bacteriocinas podem inibir o crescimento de vírus e leveduras, como demonstrado no trabalho de Wachsmann e colaboradores (2003), mostrando que a enterocina CRL35 de *Enterococcus faecium* pode se ligar e bloquear os estágios finais da replicação de vírus herpes simplex (HSV) 1 e 2, e no trabalho de Okkers *et al.* (1999) que a pentocina TV35b produzida por *L. pentosus* TV35b pode inibir a sobrevivência de *Candida albicans*.

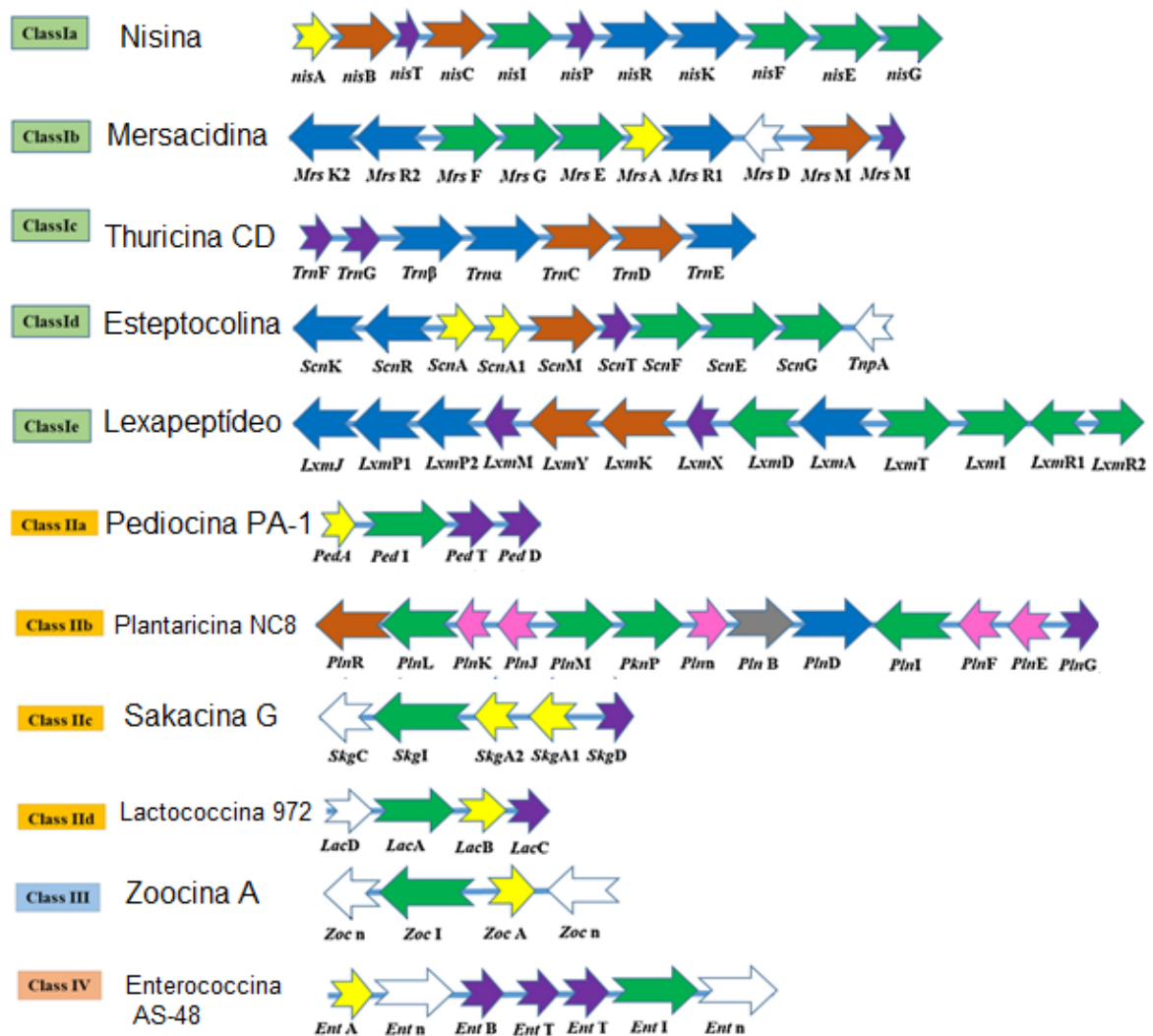
#### **4.1 Organização dos genes biossintéticos de bacteriocinas**

Independente da classe, as bacteriocinas são peptídeos com síntese ribossomal, que passam por modificações pós-traducionais. Frequentemente, os genes que codificam as bacteriocinas são organizados em operons, que podem conter mais de uma dezena de genes, como no caso do lexapeptídeo, ou somente 4, como em pediocina PA-1 (Figura 3).

A produção de uma bacteriocina ativa requer a coordenação entre muitos genes de um operon. Estruturalmente, os operons codificadores de lantibióticos (bacteriocinas classe I) possuem: a) genes estruturais que consistem em um peptídeo líder o qual se conecta ao peptídeo cerne; b) genes codificantes de enzimas biossintéticas responsáveis por modificações pós-

tradicionais dos peptídeos como uma proteína transportadora ABC que auxilia a ligação da maquinaria de modificação à membrana citoplasmática, e proteases, que auxiliam na liberação do peptídeo cerne da sequência líder, tornando o peptídeo ativo; c) genes codificadores da proteínas de imunidade; d) genes regulatórios: atuam na regulação da produção do peptídeo (Lagedroste *et al.*, 2020). A representação esquemática dos operons envolvidos na biossíntese de lantibióticos de classe I pode ser observada na Figura 3 (quadros verdes).

Figura 3 – Representação esquemática dos operons envolvidos na biossíntese de diferentes classes de bacteriocinas.



As diferentes cores indicam diferentes funções dos genes responsáveis pela biossíntese das bacteriocinas: setas laranja denotam gene de modificação, setas roxas denotam transporte e processamento, setas verdes indicam o gene de imunidade, setas azuis representam genes de regulação, setas amarelas são os genes estruturais e as setas brancas e rosa denotam funções desconhecidas.

Fonte: Adaptado de Sharma *et al.*, (2021).

No geral a maioria dos lantibióticos produzidos por bactérias Gram-positivas são ativos contra outras bactérias Gram-positivas, enquanto que possuem baixa efetividade contra bactérias Gram-negativas (Acedo *et al.*, 2018), possivelmente devido a membrana externa que impossibilita a penetração dos peptídeos (Halami, 2019). Os lantibióticos são capazes de desestabilizar a membrana por meio da formação de um poro que acarreta perda do potencial de membrana, causando a perda de metabólitos e interrupção de processos celulares. (Barbour *et al.*, 2020). Mais especificamente, os lantibióticos agem sobre o lipídeo II, um precursor do peptidoglicano de parede celular, o mecanismo, descoberto para a Plantaricina (PlnC) produzida por *Lactiplantibacillus plantarum*, envolve a formação de um complexo PlnC-lipídeo I ou PlnC-lipídeo II que impede a síntese do lipídeo II e a adição da primeira Glicina da ponte pentapeptídeo da cadeia lateral do lipídeo II (Wiedemann *et al.*, 2006).

As bacteriocinas de classe II, também chamadas de não lantibióticos, são peptídeos pequenos (< 10 kDa), não modificados, ribossomicamente sintetizados e com alto teor de glicina. São divididos em quatro subclasses: IIa, IIb, IIc e IId (Cui *et al.*, 2021). Muitos genes estão envolvidos nos operons de síntese das bacteriocinas classe II, tais quais como o peptídeo precursor, a proteína de imunidade e o transportador do tipo ABC. A organização do típico operon síntese da bacteriocina de classe II é bastante variável. Por exemplo, o operon Pediocina PA-1 consiste de quatro genes *pedA*, *pedI*, *pedT* e *pedD*, que codificam o pró-peptídeo, proteína de imunidade, transporte e processamento (Kumariya *et al.*, 2019). No que tange o processamento, destacam-se os fatores de indução, moléculas que modulam a regulação transcricional do operon de biossíntese da bacteriocina de classe II (Ríos Colombo *et al.*, 2018).

Há dois mecanismos conhecidos de regulação transcricional nas diferentes subclasses de operons de bacteriocinas de classe II. Algumas bacteriocinas da classe IIa são reguladas por meio de sistemas típicos de *quorum-sensing*, contendo três elementos no interior do operon: uma histidina quinase (HPK), um regulador de resposta (RR), e um peptídeo auto-indutor (AP) (Cui *et al.*, 2012). Em contrapartida, na maioria das outras subclasses e em muitas bacteriocinas IIa, há ausência de elementos regulatórios associados ao *quorum-sensing*, nestas o controle transcricional está diretamente envolvido com a deprivação de íons metálicos principalmente Mn (Vermeulen *et al.*, 2021).

Uma bacteriocina de classe II produzida por *Lactococcus garvieae* BCC 43578 é a Garvieacina Q (GarQ), que possui 70 aminoácidos, contendo um peptídeo líder de 20

aminoácidos, o qual é clivado no sítio Gly-Gly para gerar um peptídeo maduro GarQ de 5.339 Da, com atividade inibitória contra *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 e outras cepas de *L. garvieae* (Tosukhowong, *et al.*, 2012). A estrutura do operon biossintético de uma Garvieacina-like foi recentemente elucidada em *Lactococcus petauri* B1726, a bacteriocina de classe IId denominada Garvicina Q é codificada por um operon que consiste dos genes *garQ* (que codifica o peptídeo Garvicina Q), *garI* (que codifica uma proteína putativa de imunidade), além dos genes *garC*, e *garD* (que codificam proteínas putativas transportadoras). Adicionalmente, a expressão heteróloga de um operon sintético *garQICD* demonstrou ser suficiente para a obtenção da Garvicina Q em *Corynebacterium glutamicum* reforçando que os genes *garQICD* são responsáveis pela biossíntese e secreção do peptídeo Garvicina Q (Desiderato *et al.*, 2022).

As bacteriocinas de classe III são produzidas por uma grande diversidade de operons que diferem no que tange os genes estruturais, imunidade, transporte e processamento (Sun *et al.*, 2018). Já as bacteriocinas de classe II são modificadas pós-traducionalmente de forma que o primeiro e o último peptídeos sejam covalentemente ligados, originando uma bacteriocina madura cíclica (Vezina *et al.*, 2020).

#### **4.2 Aplicações de bacteriocinas em alimentos**

As bacteriocinas tem sido amplamente empregadas na preservação de alimentos, particularmente em produtos lácteos, cárneos, vegetais e ovos (Johnson *et al.*, 2017). Dentre as bacteriocinas produzidas por bactérias ácido-láticas, destaca-se a Nisina, efetiva contra agentes microbianos causadores de infecções alimentares e de deterioração de várias matrizes alimentares (revisto por Wu *et al.*, 2022). A Nisina, ao contrário da maioria das outras bacteriocinas, possui amplo espectro de ação, além disso, sua estabilidade perante ao calor e tolerância a pHs baixos a tornam útil para a preservação de alimentos (U.S.A. FDA 2001). Atualmente, há diversas variantes conhecidas de Nisina, produzida por *Lactococcus lactis* (Nisina Z, F e Q), alguns streptococos (Nisina H, U, U<sub>2</sub> e P), *Staphylococcus capitis* (Nisina J) e *Blautia obeum* (Nisina O). A natureza destas variantes deriva da ocorrência natural de transposons e plasmídeos, que permitem modificações genéticas, acarretando a produção de novas variantes de Nisina com atividade e propriedade distintas (revisto por Małaczewska e Kaczorek-Lukowska, 2021).

Apesar dos múltiplos pontos positivos, a eficácia da Nisina é diretamente afetada pelas suas interações com a matriz alimentar, como interações com gorduras, caseína, cátions

divalentes e falta de estabilidade estrutural em pH neutro (Ibarra-Sánchez *et al.*, 2020). Essas limitações afetam particularmente o uso da Nisina em queijos com pH neutro, como o Queso Fresco, no qual esta permanece ativa por poucos dias (Ibarra-Sánchez *et al.*, 2018). Por isso, novas estratégias de aplicação da Nisina, bem como a busca por novas bacteriocinas mais eficientes e estáveis estão no cerne das pesquisas envolvendo bacteriocinas em alimentos.

Uma das formas mais promissoras para estender a atividade de bacteriocinas em alimentos é encapsulá-las. O encapsulamento possibilita a liberação gradual da bacteriocina na matriz alimentar, permitindo a manutenção da concentração mínima inibitória por mais tempo. Através desta abordagem foi possível incrementar a eficácia da Nisina contra *L. monocytogenes* em Queso Fresco, resultando em contagens de até 2 log UFC · g<sup>-1</sup> de patógeno menores do que em queijos utilizando a Nisina livre (Feng *et al.*, 2019). Outra estratégia ativamente pesquisada envolve o uso da Nisina com outras substâncias antimicrobianas, a fim de eliciar efeitos sinérgicos (Lopes *et al.*, 2019).

O desenvolvimento de embalagens contendo compostos antimicrobianos se tornou outra via promissora para a aplicabilidade das bacteriocinas. Essa abordagem pode reduzir a interação das bacteriocinas com os componentes dos alimentos através de sua incorporação em polímeros ou filmes proteicos degradáveis (Ibarra-Sánchez *et al.*, 2019). Nesse contexto, a incorporação da Nisina, ou qualquer outra bacteriocina, pode ser obtida por meio de calor sob alta pressão e aderência a filmes de zeína de soja ou milho (Aytac *et al.*, 2020), muitos outros polímeros biodegradáveis também estão sendo estudados (revisado por Gumienna e Górna *et al.*, 2021).

### **4.3 Bacteriocinas em *L. rhamnosus***

Diversos estudos têm sido desenvolvidos com cepas bacteriocinogênicas ácido lácticas (Mokoena *et al.*, 2017; Agriopoulou *et al.*, 2020), muitas das quais são reconhecidas como probióticas (Hegarty *et al.*, 2016), e devido a isto as bacteriocinas produzidas por estas cepas são também consideradas moléculas efetoras probióticas, uma vez que a produção de compostos antimicrobianos que suprimam microrganismos patogênicos são mecanismos pelos quais os probióticos modulam o microbioma do hospedeiro e auxiliam na sua manutenção (Daliri *et al.*, 2021).

Em *L. rhamnosus*, foi demonstrado através de ensaios *in vitro*, que as bacteriocinas produzidas podem inibir o crescimento de *E. coli*, além de atuar contra uma ampla gama de patógenos (Tkhruni *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2020). Tanto *L. rhamnosus* 1.0320, isolado de

koumiss (Xu *et al.*, 2021), e *L. rhamnosus* L156.4, obtido de fezes de camundongo (Oliveira *et al.*, 2017), foram sequenciados e descritos como produtores de bacteriocina. Além disso, Tkhruni e colaboradores (2020) reportaram a inibição do crescimento de bactérias patogênicas multirresistentes através da atuação de bacteriocinas sintetizadas por *L. rhamnosus*, isolado de queijo tradicional armênio.

Alguns trabalhos purificaram e caracterizaram bacteriocinas produzidas por cepas de *L. rhamnosus*. Nesse sentido, Xu *et al.* (2021) mostraram que *L. rhamnosus* produz uma bacteriocina com 1-3.3 KDa, capaz de exercer atividade bactericida contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, com concentração mínima inibitória de 0,072 mg/mL contra *E. coli* UB1005. A bacteriocina purificada age por meio da formação de poros na superfície da membrana citoplasmática, aumentando a permeabilidade e dissipando o potencial de membrana bem como o gradiente de pH transmembrana. Uma abordagem similar foi empregada no estudo de *Lacticaseibacillus rhamnosus* XN2, isolado de iogurte, a partir do qual obteve-se a purificação parcial de uma bacteriocina com atividade contra *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Micrococcus luteus*, *Brochothrix thermosphacta*, *Clostridium butyricum*, *S. aureus*, *Listeria innocua*, *L. monocytogenes*, e *E. coli*. Adicionalmente, a bacteriocina denominada XN2, quando aplicada em concentrações sub-letais, demonstrou ser capaz de reduzir a formação de biofilme, interferindo com os níveis transcricionais do gene *luxS*, que codifica a molécula sinal (autoindutor 2) (Wei *et al.*, 2022). Bacteriocinas de baixo peso molecular e amplo espectro de ação também foram reportadas no sobrenadante de *L. rhamnosus* BTK 20-12 (Tkhruni *et al.*, 2020).

A aplicabilidade das bacteriocinas produzidas por *L. rhamnosus* em alimentos, foi demonstrada para a bacteriocina GP1, produzida por *L. rhamnosus* GP1. A molécula GP1 foi testada quanto a sua capacidade de inibir o crescimento de *Staphylococcus* sp., *Aeromonas* sp., coliformes totais, *Lactobacillus* sp., *Pseudomonas* sp. e *Vibrio* sp. em amostras de pescados congelados. Embora não tenha sido possível detectar melhoria nas condições sensoriais nas amostras tratadas com a bacteriocina GP1 em relação ao controle, o conteúdo total de nitrogênio volátil das amostras tratadas com GP1 e armazenadas a 4°C permaneceu dentro do limite aceitável (35 mg/100 g) ao fim de 21 dias, o que não ocorreu no sistema controle (Sarika *et al.*, 2019).

Ainda que a maioria das cepas bacteriocinogênicas seja descoberta por meio de amplos testes de *screening*, abordagens *in silico* também foram empregadas na detecção de sequências

potencialmente classificadas como potenciais bacteriocinas em genomas de cepas de *L. rhamnosus*. Essa estratégia utiliza bancos de dados públicos de genes anotados como codificadores de bacteriocinas, como o BAGEL3 (Van heel *et al.*, 2013) e sua versão mais recente o BAGEL4 (Van heel *et al.*, 2018), para prever a função de genes em genomas de interesse. Esse conceito revelou a presença de uma bacteriocina putativa codificada no genoma de *L. rhamnosus* L156.4, que foi posteriormente confirmada por ensaios *in vitro* (Oliveira *et al.*, 2017). A mesma lógica foi aplicada por Dutra-Silva *et al.* (2021), e confirmou não somente a ampla distribuição de operons codificadores de bacteriocinas em toda a espécie *L. rhamnosus*, bem como revelou a presença de um operon contendo o gene *garQ*, que codifica a bacteriocina de classe II Garvieacina Q. Esse operon biossintético encontra-se conservado em somente um clado, indicando que o gene *garQ* pode ter sido transferido horizontalmente e ter sido mantido por conferir uma característica benéfica para essas cepas.

## CAPÍTULO II

### DISTRIBUIÇÃO DE GENES RELACIONADOS A EFEITOS PROBIÓTICOS EM *LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS* REVELADA PELA ESTRUTURA DE POPULAÇÃO

Artigo publicado: DUTRA-SILVA, L.; MATTEOLI, F. P.; ARISI, A. C. M. Distribution of Genes Related to Probiotic Effects Across *Lacticaseibacillus rhamnosus* Revealed by Population Structure. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, p. 1-10, 2021.



## RESUMO

O Gram-positivo *Lacticaseibacillus rhamnosus* tem sido amplamente relatado como capaz de exercer efeitos benéficos à saúde. A diversidade genômica bacteriana pode promover especialização de nicho, criando subpadrões dentro das populações. Como os efeitos vantajosos de *L. rhamnosus* foram amplamente relatados em nível de cepa e pouco se sabe sobre a distribuição de genes benéficos entre cepas de *L. rhamnosus*, investigamos todos os genomas disponíveis publicamente dos gêneros *Lactobacillus* e *Lacticaseibacillus* para estudar o pangenoma e a estrutura geral da população de *L. rhamnosus*. A tipagem de sequência multilocus do genoma central detectou oito filogrupos de *L. rhamnosus* (PG1 a PG8). *L. rhamnosus* abriga um pangenoma aberto; PG1, PG3, PG4 e PG5 exibiram padrões de distribuição de genes altamente conservados. Os genes significativamente associados ao PG1, que compreende *L. rhamnosus* GG, são principalmente relacionados a fagos. O operon de adesão spaCBA-srtC1 foi encontrado em 44 (24,7%) genomas; entretanto, considerando apenas o GP1, a prevalência foi de 65%. No PG2 a prevalência spaCBA-srtC1 foi de 43%. No entanto, tanto as linhagens humanas quanto as derivadas do leite abrigavam esse operon. Além disso, dois tipos principais de clusters de bacteriocinas foram encontrados (Bact1 e Bact2). As previsões de Bact1 indicam a presença de garQ, que codifica a bacteriocina classe II garvieacina Q, que está presente principalmente no subgrupo PG8A e PG2 intimamente relacionado. PG2 abriga dois subgrupos distintos, abrigando spaCBA-srtC1 ou Bact1. Nossas descobertas fornecem novos insights sobre a distribuição de genes biotecnológicos relevantes na população de *L. rhamnosus*, revelando padrões intra-espécies que podem levar ao desenvolvimento de produtos probióticos mais eficientes.

## 1. INTRODUÇÃO

*Lacticaseibacillus rhamnosus* é uma bactéria Gram-positiva amplamente caracterizada como probiótica, devido aos extensos relatos de efeitos benéficos para a saúde humana derivados da sua utilização, tais quais a prevenção da disbiose vaginal (Pino *et al.*, 2021), atenuação da colite ulcerativa (Liu *et al.*, 2020) e redução da inflamação do fígado, relacionado à doença hepática gordurosa não alcoólica (Wang *et al.*, 2020).

Desde a descrição do *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) em 1989, um vasto número de cepas foi descrito como potencial probiótico (Capurso L., 2019). *L. rhamnosus* Lcr35 (Nivoliez *et al.*, 2012), *L. rhamnosus* MTCC-5897 (Bhat *et al.*, 2019, 2020), e *L. rhamnosus* LOCK900 (Aleksandrak-Piekarczyk *et al.*, 2013) estão entre os isolados não *L. rhamnosus* GG, que são comumente classificados como potenciais probióticos devido a capacidade de adesão demonstrada em testes com culturas de células ou experimentos com camundongos. Apesar desses resultados comuns às várias cepas, estudos clínicos utilizando a administração de probióticos de forma controlada delinearam o paradigma de que os efeitos benéficos de probióticos bacterianos são cepa-específico (Johnson *et al.*, 2014). Este cenário, em conjunto com a recente reclassificação do gênero *Lactobacillus*, utilizando genômica comparativa, e a subsequente criação do gênero *Lacticaseibacillus* (Zheng *et al.*, 2020), constitui o cenário oportuno para desenvolvimento de estudos de genômica comparativa em *L. rhamnosus*.

Apesar da ampla disponibilidade de relatos de efeitos benéficos promovidos pela administração de *L. rhamnosus* (Capurso L., 2019; Bousmaha-Marroki *et al.*, 2021), identificar genes que codificam proteínas diretamente envolvidas nesses processos não é uma tarefa simples, devido aos intrincados mecanismos desencadeados pela introdução de uma população bacteriana exógena viva na microbiota intestinal (revisto por Lebeer *et al.* 2018). De toda maneira, a adesão às células alvos do hospedeiro é considerada um dos poucos traços probióticos unânimes que um potencial probiótico bacteriano deve possuir. Em *L. rhamnosus* a adesina Spa possui duas formas, codificadas pelos operons *spaCBA-srtC1* e *spaFED-srtC2*, sendo a primeira mais diretamente relacionada aos efeitos probióticos, pois já foi demonstrado seu papel essencial na capacidade de promover a adesão *in vitro* de *L. rhamnosus* GG (LGG) às células do epitélio intestinal (Lebeer *et al.*, 2012), assim como ligar-se à  $\beta$ -lactoglobulina do leite (Guerin *et al.*, 2018). Adicionalmente, Douillard *et al.* (2014) demonstraram a alta conservação de dois tipos de motivo LPXTG nas proteínas SpaCBA em diferentes espécies de bactérias Gram-positivas, incluindo *L. rhamnosus*.

As bacteriocinas são um grupo diverso de peptídeos sintetizados ribossomalmente por bactérias, com atividade antimicrobiana contra outras bactérias, enquanto que a bactéria produtora é imune a seu peptídeo (Hegarty *et al.*, 2016). Ensaios *in vitro* demonstraram que bacteriocinas produzidas por *L. rhamnosus* podem impedir o crescimento de *Escherichia coli* (Zhao *et al.*, 2020) ou até mesmo inibir uma ampla gama de patógenos Gram-positivos e Gram-negativos (Tkhruni *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2021). Ambos *L. rhamnosus* 1.0320, isolado de

koumiss (Xu *et al.*, 2021), e *L. rhamnosus* L156.4, obtido de fezes de camundongos (Oliveira *et al.*, 2017), foram sequenciados e descritos como produtores de bacteriocinas, indicando que o potencial genômico para competir com outras bactérias via bacteriocinas, pode estar presente em várias cepas de *L. rhamnosus*, independente da fonte de isolamento.

A genômica microbiana de populações utiliza dados de sequenciamento genômico do maior número possível de indivíduos da mesma espécie para monitoramento, estudo ou controle de populações bacterianas (Sheppard *et al.*, 2018). Esta abordagem tem sido amplamente utilizada na microbiologia de alimentos (Moura *et al.*, 2016). Nesse trabalho, a estrutura de população da espécie probiótica *L. rhamnosus* foi elucidada e utilizada para mapear a distribuição de genes relacionados aos efeitos probióticos. Isolados com potencial genético para produzir bacteriocinas de interesse serão testados.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção e curagem dos genomas

Todos os genomas públicos dos gêneros *Lactobacillus* spp. e *Lacticaseibacillus* spp. disponíveis, na base de dados RefSeq (O'leary *et al.*, 2016), em 28 de outubro de 2020 foram obtidos (n = 2,094). A curagem manual dos genomas foi realizada utilizando o pipeline Bacsort (<https://github.com/rrwick/Bacsort>). O Bacsort constitui um conjunto de *scripts* que se baseia na distância genômica calculada por Mash (Ondov *et al.*, 2016). O *software* Mash utiliza-se da abordagem MinHash, que emprega a redução da dimensionalidade para compilar distâncias inter-genômicas associadas a um valor de *p*, permitindo assim a clusterização de coleções de sequências massivas em *hashs* (resumos). Em última análise, Mash constitui-se de uma ferramenta capaz de estimar a similaridade entre genomas sem a pré-realização de um alinhamento. As distâncias foram utilizadas para construir um dendrograma utilizando neighbor-joining com o algoritmo BIONJ (Gascuel, 1997) e o pacote em R ape (Paradis *et al.*, 2004). Segundo Ondov et al. (2016) uma distância Mash  $\leq 0.05$  equivale a identidade média de nucleotídeo – do inglês ANI -  $\geq 95\%$ .

### 2.2 Filtragem de qualidade dos genomas de *Lacticaseibacillus*

Um total de 279 genomas foram pré-classificados como *Lacticaseibacillus*. Esses foram filtrados em relação a qualidade de suas sequências utilizando o software BUSCO 4.0.6 (Seppey

*et al.*, 2019), foram mantidos somente àqueles com, pelo menos, 90% dos ortólogos de cópia única presentes no *dataset* de *Lactobacillales*. Após a filtragem restaram 187 genomas de alta qualidade de *L. rhamnosus*.

### **2.3 Obtenção do *core* MLST e inferência da estrutura de população de *L. rhamnosus***

Uma abordagem *gene-by-gene*, preconizada por Maiden, *et al.* (2013), foi utilizada para inferir a estrutura de população. Nesse intuito, o *software* chewBBACA 2.1.0 (Silva *et al.*, 2018) foi empregado para realizar a predição e curagem dos alelos dos 187 genomas de *L. rhamnosus* em *schemas* de genoma inteiro – do inglês wgMLST – e do genoma conservado ou *core* – do inglês cgMLST. O *schema* wgMLST foi composto por 6,002 loci. Nove genomas faltando mais de 1% dos loci presentes em mais de 95% dos genomas, foram excluídos da análise. O *schema* cgMLST constituiu-se de 713 loci presentes em todos os 178 genomas.

Cada locus presente no cgMLST foi alinhado individualmente usando MUSCLE 3.8.31 (Edgar, 2004). Os alinhamentos foram concatenados acarretando um total de 547,609 pbs de tamanho total. Posteriormente, 40,846 *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) foram obtidos a partir do alinhamento concatenado utilizando o *software* snp-sites 2.3.3 (Page, *et al.*, 2016). A reconstrução filogenética de *L. rhamnosus* foi realizada utilizando o método de máxima verossimilhança com o auxílio do *software* IQ-Tree2 1.6.10 (Minh, *et al.*, 2020) com os parâmetros MFP + *ascertainment bias correction* e 1000 replicatas de bootstrap. A árvore filogenética resultante foi visualizada através da ferramenta online iTOL v4 (Letunic e Bork, 2019).

Finalmente, os SNPs obtidos a partir do alinhamento do cgMLST e a filogenia gerada com os SNPs foram utilizados para alimentar o algoritmo fastBAPS 1.0.3 (Tonkin-Hill *et al.*, 2019), que realiza clusterização hierárquica baseada em modelos de Dirichlet e prediz a quantidade de filogrupos que constituem uma determinada população.

### **2.4 Determinação do pan-genoma de *L. rhamnosus* e análises de genomas completos de cada filogrupo**

O pangenome de *L. rhamnosus* foi obtido usando o *software* Roary 3.13.0 (Page *et al.*, 2015). Genes com mais de 95% de identidade foram clusterizados na mesma família gênica. A

matriz de presença e ausência de genes foi analisada com o *software* Scoary 1.1.16 (Brynildsrud *et al.*, 2016).

Em seguida foi realizado o alinhamento de genoma inteiro utilizando pelo menos um, quando disponível, *assembly* completo para cada filogruppo, com a ferramenta blastn 2.11 (Altschul *et al.*, 1990). A imagem de comparação dos anéis foi obtida utilizando CGView Comparison tool 1.0 (Grant *et al.*, 2012). O serviço *on-line* PHASTER (Arndt *et al.*, 2016) foi utilizado para buscar por sequências de fagos no genoma de *L. rhamnosus* GG – ATCC 53103 (AP011548.1).

## **2.5 Distribuição de genes associados aos efeitos probióticos nos filogrupos de *L. rhamnosus***

Alinhamentos utilizando blastp foram realizados para determinar a presença de genes codificantes da proteína Spa. Para tanto foram utilizadas as seguintes sequências curadas de proteínas de *L. rhamnosus* GG como *queries*: SpaF (BAI42808.1), SpaE (BAI42807.1), SpaD (BAI42806.1), SrtC2 (BAI42805.1), SpaC (BAI40955.1), SpaB (BAI40954.1), SpaA (BAI40953.1) e SrtC1 (BAI40952.1). Apenas hits com  $\geq 70\%$  cobertura e 90% de identidade foram considerados. Os resultados do blastp foram mapeados na árvore filogenética em formato radial previamente obtido no iTOL v4 (Letunic e Bork, 2019). Alinhamento múltiplo de sequências das proteínas codificadas pelo *operon* SpaCBA foram realizados utilizando o *software* MUSCLE 3.8.31 (Edgar, 2004). Os *motifs* LPXTG foram visualizados utilizando a ferramenta *on-line* WebLogo 3 (Schneider e Stephens, 1990). A ocorrência de bacteriocina foi realizada utilizando o banco de dados BAGEL 4 (Van Heel *et al.*, 2018).

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

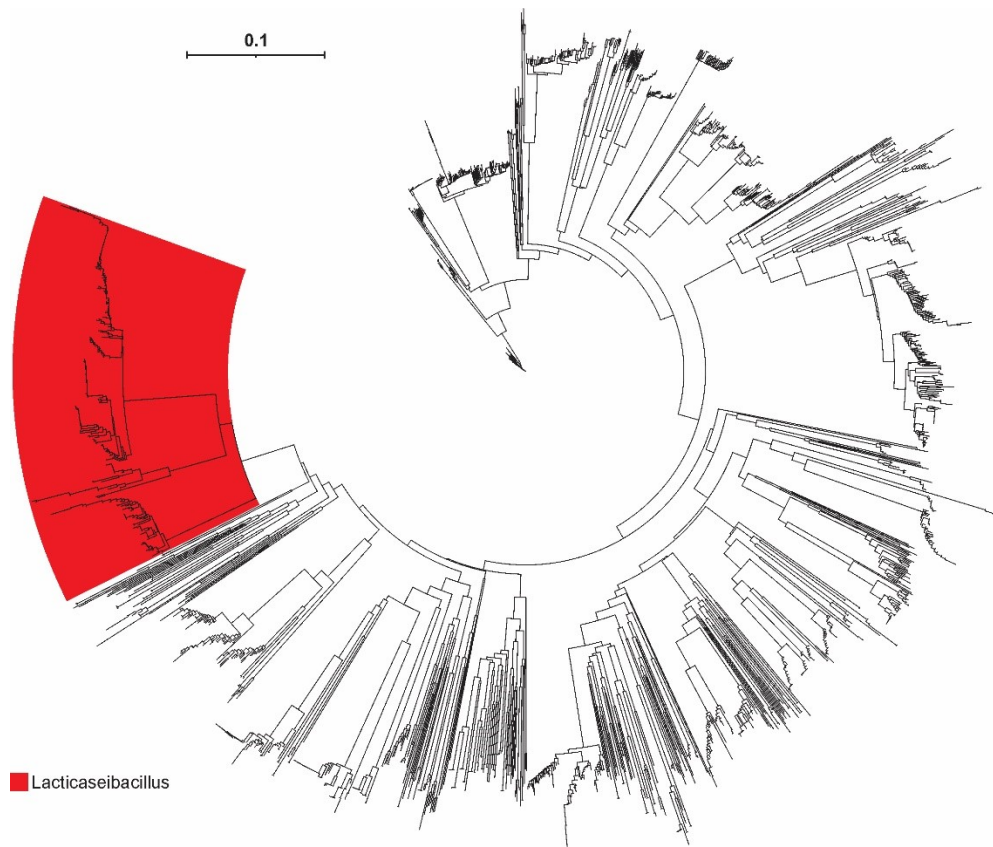
Todos os genomas disponíveis no banco de dados RefSeq (n = 2,094) para os gêneros *Lactobacillus* spp. e *Lacticaseibacillus* spp. foram obtidos. Utilizando a métrica de ANI, 12 genomas foram reclassificados de *Lacticaseibacillus* sp. para *L. rhamnosus* (Tabela 1).

Tabela 1 – Genomas reclassificados para *L. rhamnosus*.

<b>Código de acesso ao <i>assembly</i></b>	<b>Cepa</b>
GCF_001807635	<i>Lactobacillus</i> sp. HMSC17G08
GCF_001809485	<i>Lactobacillus</i> sp. HMSC072E07
GCF_001809645	<i>Lactobacillus</i> sp. HMSC068B07
GCF_001809765	<i>Lactobacillus</i> sp. HMSC064F12
GCF_001809975	<i>Lactobacillus</i> sp. HMSC077C11
GCF_001810115	<i>Lactobacillus</i> sp. HMSC078F07
GCF_001812155	<i>Lactobacillus</i> sp. HMSC066G01
GCF_001812685	<i>Lactobacillus</i> sp. HMSC061B07
GCF_001813825	<i>Lactobacillus</i> sp. HMSC073B09
GCF_001814335	<i>Lactobacillus</i> sp. HMSC075D02
GCF_001814405	<i>Lactobacillus</i> sp. HMSC056D05
GCF_001815435	<i>Lactobacillus</i> sp. HMSC073D04

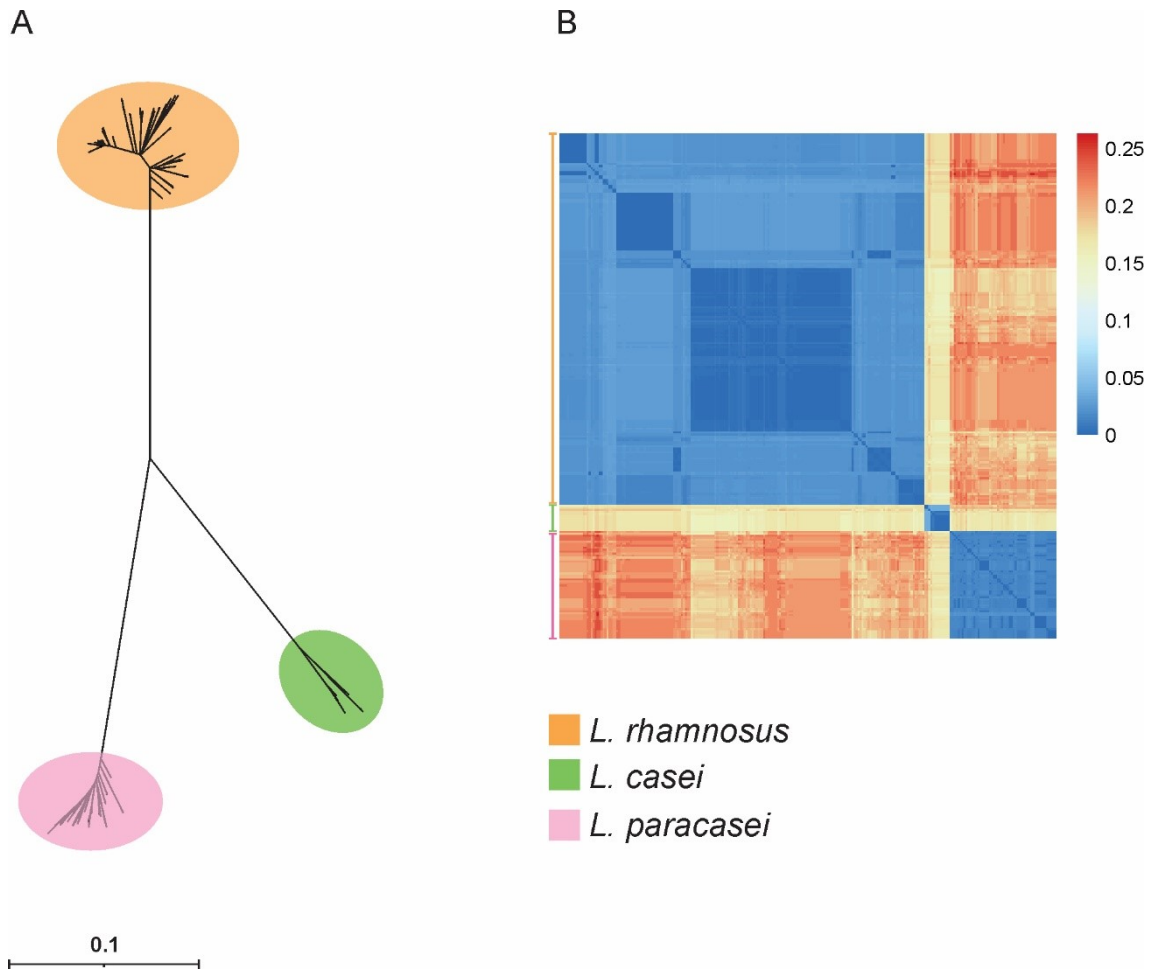
A distância genômica de Mash foi calculada e a matriz obtida utilizada para inferir um dendrograma por *neighbor-joining* que possibilitou verificar que os genomas pertencentes ao gênero *Lacticaseibacillus* agrupavam-se de forma consistente em três ramos principais (Figura 1). Um total de 295 genomas compunham o gênero *Lacticaseibacillus* inicialmente. Para garantir que as análises posteriores seriam realizadas em *assemblies* confiáveis, somente genomas que apresentaram pelo menos 90% dos ortólogos de cópia única da família *Lactobacillaceae* e distância Mash  $\leq 0.05$  com *L. casei*, *L. paracasei* ou *L. rhamnosus*, as principais espécies do gênero *Lacticaseibacillus*, foram mantidos. Essa etapa acarretou a remoção de 41 *assemblies*.

Figura 1 - Dendrograma radial da distância genômica de mash inferido por *neighbor-joining*.



Os 254 genomas filtrados para o gênero *Lacticaseibacillus* foram utilizados para inspecionar a diversidade genômica do gênero. Para tal, foi obtido um dendrograma sem raiz utilizando a distância de Mash, que evidencia a distinção clara entre *L. casei*, *L. paracasei* ou *L. rhamnosus* (Figura 2A). Através da análise do mapa de calor construído a partir da distância genômica de Mash, foi possível inferir a presença de clusters genômicos intra *L. rhamnosus* (Figura 2B).

Figura 2 - Diversidade genômica das principais espécies do gênero *Lacticaseibacillus*.



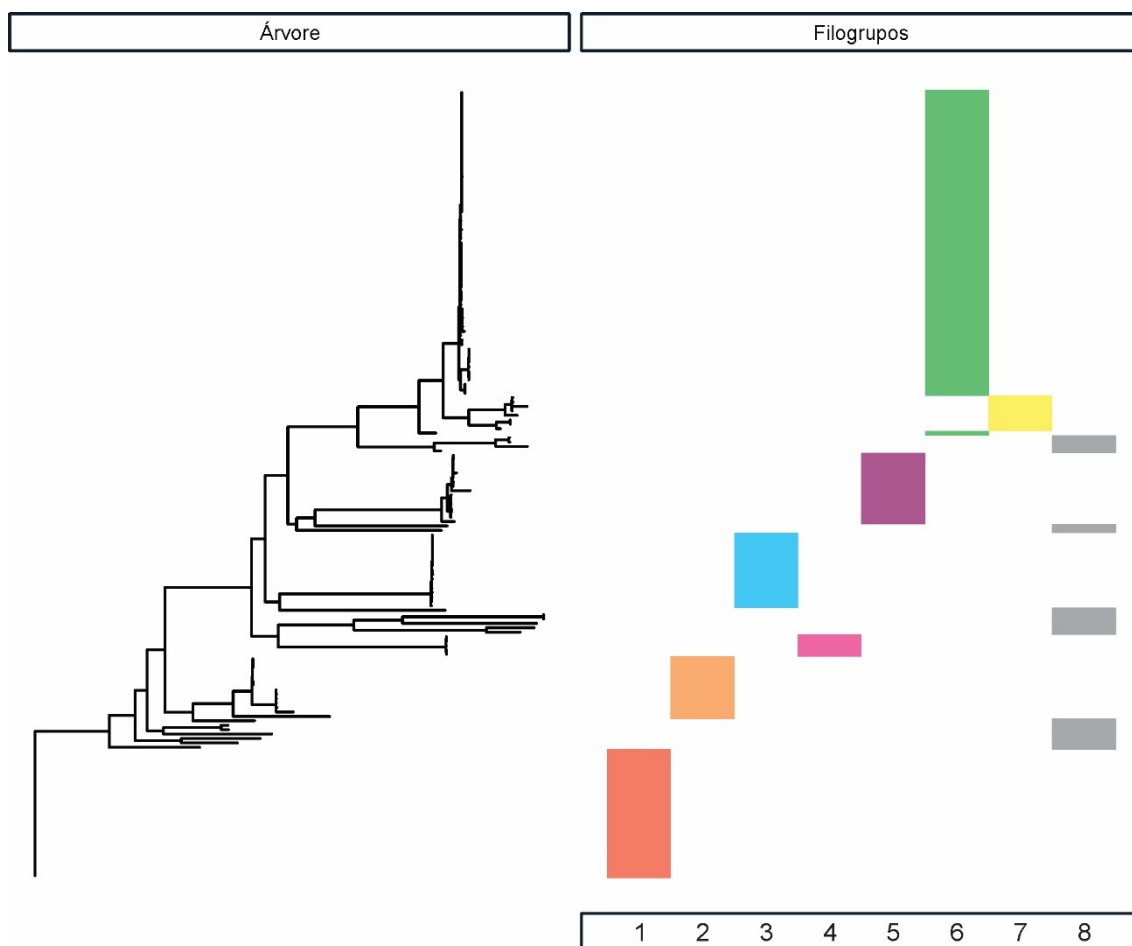
A) Dendrograma sem raiz obtido por *neighbor-joining* a partir da distância genômica de Mash. A legenda de cor delimita as três espécies principais do gênero. B) Mapa de calor da distância genômica de Mash, a palheta quente-para-frio representa a similaridade genômica entre um par de genomas, zero significa ausência de diferenças (i.e. 100% de similaridade).

Com o intuito estudar os filogrupos que constituem a população de *L. rhamnosus* os 186 *assemblies* desta espécie foram utilizados para construir um esquema alélico para genoma inteiro – do inglês *whole-genome multilocus sequence typing* (wgMLST). Após filtrar *assemblies* cujo conteúdo alélico diferia mais de 1% em *loci* conservados em mais de 95% dos genomas, um conjunto final de 178 *assemblies* de *L. rhamnosus* foi obtido. Em seguida uma árvore filogenética por máxima verossimilhança foi construída utilizando os 713 *loci* compartilhados por todos os 178 genomas (*core loci*). A filogenia em conjunto com alinhamento dos *core loci* (cgMLST) permitiu inferir a presença de oito filogrupos (Figura 3).



Os diferentes filogrupos variaram no que tange à similaridade interna, sendo os filogrupos PG1, PG3, PG4 e PG5 os mais homogêneos, devido aos seus menores tamanhos de ramos internos. Em contrapartida, nos filogrupos PG2, PG6 e PG7 a presença de subclusters pode ser observada, indicando que estes possuem maior diversidade genômica. O filogrupo 8 não apresentou congruência com a árvore filogenética, o que pode indicar que este é na verdade constituído por filogrupos distintos que as análises não foram capazes de elucidar. A vasta maioria dos isolados de *L. rhamnosus* analisados, 70,55% foram isolados de hospedeiros humanos, enquanto que 21,91% foram isolados de laticínios ou probióticos comerciais. Nenhuma correlação foi observada entre a região geográfica de isolamento ou a fonte de isolamento e os filogrupos.

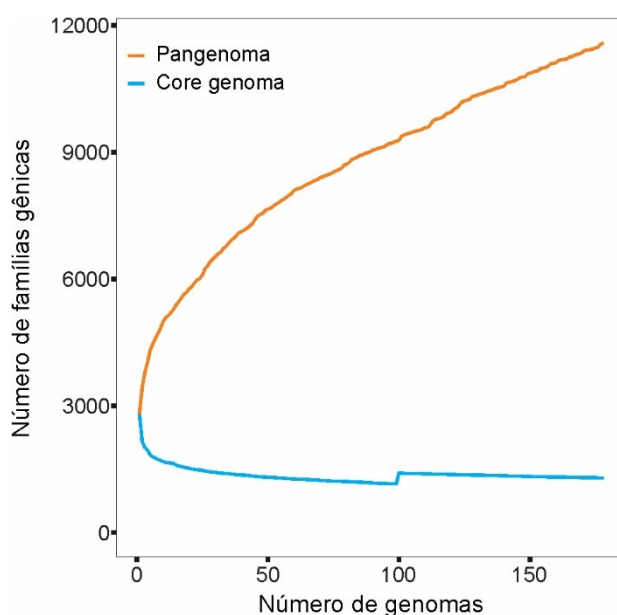
Figura 3 - A estrutura de população de *Lacticaseibacillus rhamnosus*.



Um total de 178 genomas de *L. rhamnosus* foi utilizado para obter a filogenia cgMLST por máxima verossimilhança. Oito filogrupos foram preditos utilizando clusterização Bayesiana.

Para estudar a distribuição dos genes em *L. rhamnosus*, os genes codificantes de proteínas dos 178 genomas foram utilizados para construir um pan-genoma. O pan-genoma compreendeu 11,574 famílias gênicas, das quais 1,294 foram compartilhadas por  $\geq 99\%$  dos genomas (*i.e.* core genoma) (Figura 4).

Figura 4 - O pan-genoma de *Lacticaseibacillus rhamnosus*.

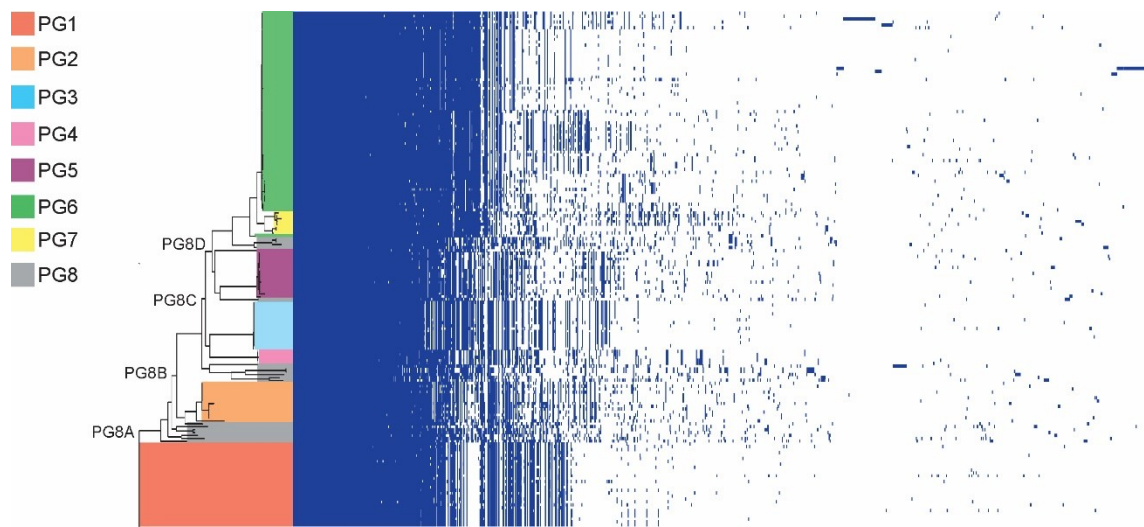


Curvas laranja e azul representam o pan- e core genomas dos 178 genomas de *L. rhamnosus*. O genoma core foi definido como genes presentes em mais de 99% das cepas.

A curva característica obtida para a distribuição das famílias gênicas na população de *L. rhamnosus* indica que esse pan-genoma é aberto, ou seja, a diversidade gênica da espécie ainda é desconhecida. Essa é uma inferência que corrobora a alta diversidade gênica de *L. rhamnosus*.

Em seguida, a matriz de presença e ausência dos genes do pan-genoma foi utilizada, em conjunto com a árvore filogenética por verossimilhança de cgMLST, para visualizar a distribuição do pan-genoma nos oito filogrupos. Os filogrupos mais homogêneos PG1, PG3, PG4 e PG5 também exibiram padrões conservados de presença e ausência, enquanto que alguns isolados, principalmente no PG6, exibiram alto número de famílias de genes únicos (Figura 5).

Figura 5 - A estrutura de população e a matriz de presença e ausência do pan-genoma de *Lacticaseibacillus rhamnosus*.

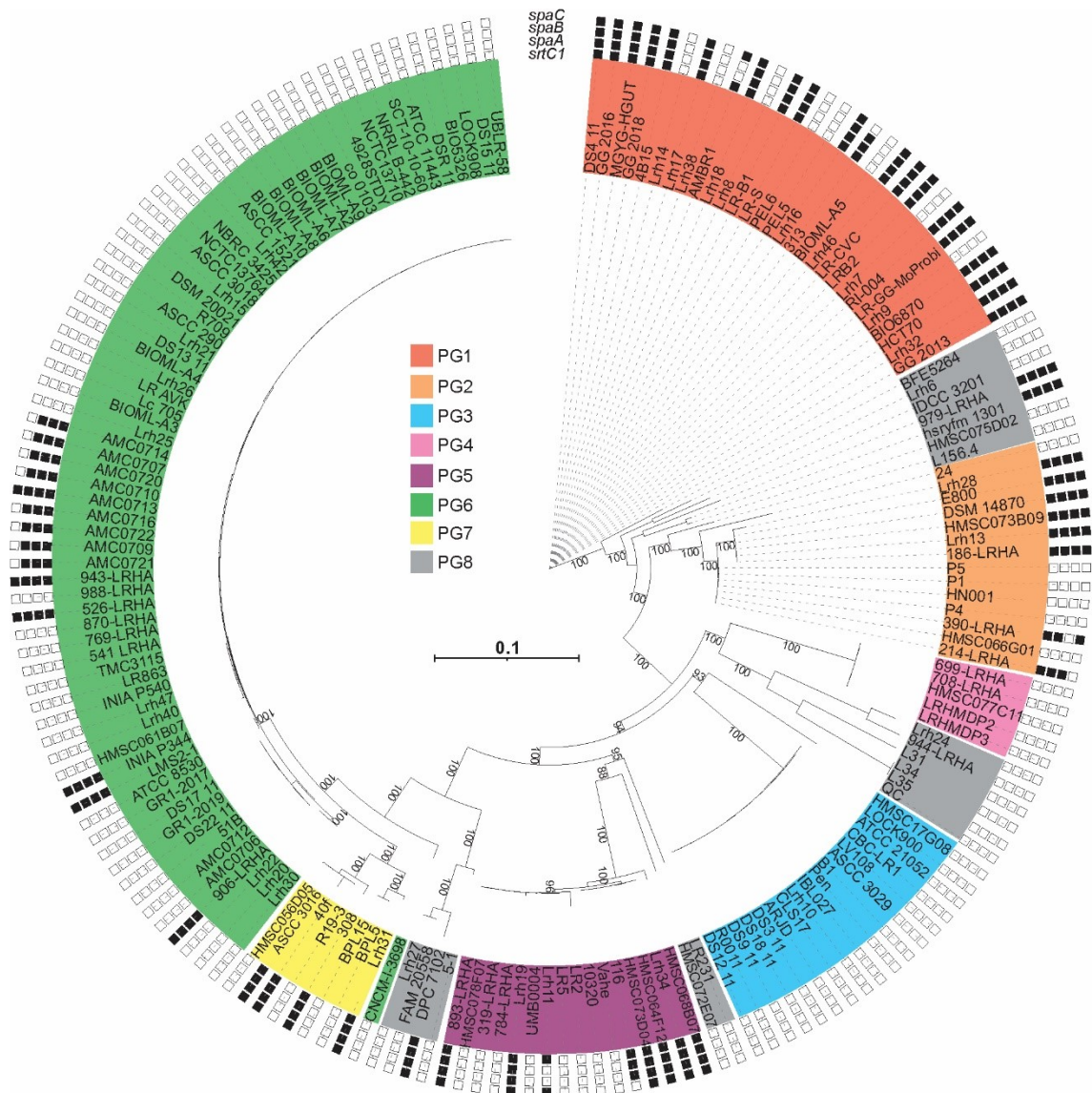


Padrões conservados podem ser observados associados aos filogrupos. A legenda de cor relaciona-se com o filogrupo.

A estrutura de população de *L. rhamnosus* foi explorada para investigar a distribuição dos genes constituintes do operon de pilus *spaCBA-srtC1* e *spaFED-srtC2*. A presença ou ausência do operon *spaCBA-srtC1* foi visualizada através da árvore filogenética radial calculada por máxima verossimilhança utilizando o cgMLST (Figura 6).

Considerando apenas a presença completa dos quatro genes do operon *spaCBA-srtC1*, 44 genomas (24,7%) o apresentaram completo. O PG1 exibiu a maior prevalência de genomas contendo o operon *spaCBA-srtC1* (65%). Um padrão dualístico foi observado no filogrupo PG2, no qual um subcluster possui o operon *spaCBA-srtC1* em todos os genomas, ao passo que no outro subcluster esse é ausente ou incompleto. Entre os 44 genomas contendo o operon *spaCBA-srtC1*, 37 (84%) foram isolados do microbioma humano e 4 (9%) foram isolados de produtos lácteos. Dois genomas não possuíam informações relativas ao isolamento e um foi obtido de um produto comercial (Tabela S1).

Figura 6 - Distribuição do operon *spaCBA-srtc1* nos filogrupos de *Lacticaseibacillus rhamnosus* visualizada por uma árvore filogenética radial calculada pelo método de verossimilhança utilizando o cgMLST.



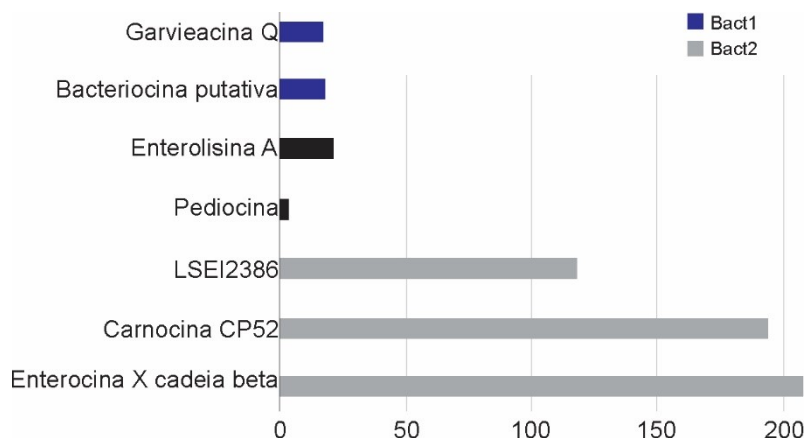
A presença ou ausência do operon *spaCBA-srtc1* é denotada pelos quadrados cheios ou vazios, respectivamente. A legenda de cor representa os oito filogrupos encontrados.

Os resultados também mostraram que o operon *spaFED-srtc2* está presente em todos os genomas de *L. rhamnosus*, e por isso está presente no genoma core.

Em seguida, os genomas foram utilizados para realizar a busca por regiões relacionadas à produção de bacteriocinas. As regiões genômicas contendo genes associados às bacteriocinas

foram denominadas como áreas de interesse. Nossos resultados mostram que pelo menos uma área de interesse está presente em todos os genomas de *L. rhamnosus*. A vasta maioria da população de *L. rhamnosus* analisada possui apenas uma área de interesse (n = 106), enquanto que 52, 16 e quatro genomas possuem duas, três e quatro áreas de interesse, respectivamente. Um total de 578 ORFs codificantes de genes relacionados à bacteriocinas foram encontrados nos 178 genomas, principalmente do tipo II (n = 557) e tipo III (n = 21). Sete tipos de genes distintos codificantes de bacteriocinas foram encontrados, três mais frequentemente; LSEI2386, carnocina CP52 e enterocina X cadeia beta, e quatro mais raramente; enterolisina A, garvieacina Q, pediocina e uma bacteriocina putativa. Os genes codificantes de bacteriocina estão organizados em quatro tipos principais de áreas de interesse; contendo somente enterolisina A ou pediocina, ou ainda garvieacina Q associada a uma bacteriocina putativa (Bact1), e finalmente, LSEI2386, carnocina CP52 e enterocina X cadeia beta (Bact2) (Figura 7). Bact1 foi encontrada em 17 genomas (9,55%) sempre contendo ambos garvieacina Q e a bacteriocina putativa. Bact2 foi encontrado em todos os genomas de *L. rhamnosus*, porém o gene LSEI2386 estava ausente em 37% dos genomas.

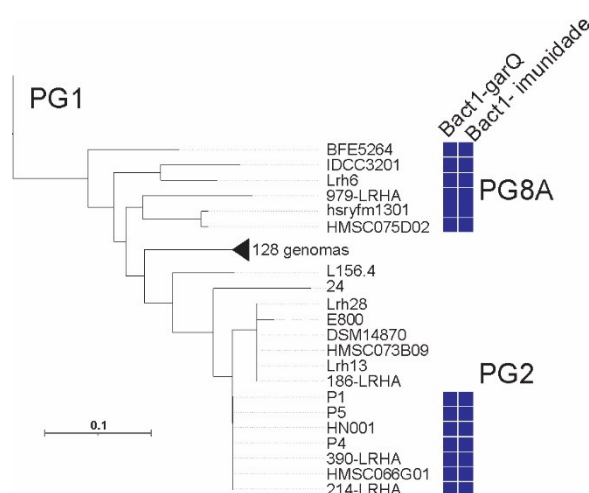
Figura 7 - Diversidade de bacteriocinas em *Lacticaseibacillus rhamnosus*.



Sete tipos distintos de genes codificantes de bacteriocinas foram encontrados nos 178 genomas de *L. rhamnosus*. Dois clusters típicos são constituídos por garvieacina Q com uma bacteriocina putativa (Bact1), ou LSEI2386, Carnocina CP52 e enterocina X cadeia beta (Bact2).

O cluster Bact1 foi encontrado em sete, dois e oito genomas de *L. rhamnosus* nos PG2, PG6 e PG8, respectivamente. Apesar de sua escassa distribuição na população de *L. rhamnosus*, o filogruppo PG2 e o cluster vizinho PG8A apresentaram alta concentração de genomas (n = 15) contendo esse cluster gênico associado à garvieacina Q. Por isso, investigamos a conservação do cluster Bact1 nos filogruppos PG2-PG8A, utilizando buscas por blastp a partir da sequência da proteína GarQ, em conjunto com a proteína de imunidade à bacteriocina adjacente, presentes no genoma fechado de *L. rhamnosus* IDCC 3201; GEK51\_11670 e GEK51\_11665, respectivamente. Os resultados confirmaram que GarQ e a proteína de imunidade à bacteriocina são sempre encontrados adjacentes um ao outro em todos os 15 genomas dos filogruppos PG2-PG8A contendo Bact1 (Figura 8). Além disso, essas sequências compartilham 100% de identidade e cobertura da query.

Figura 8 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança.



Árvore filogenética calculada por máxima verossimilhança a partir do cgMLST em visualização colapsada para evidenciar a presença do cluster gênico de produção de bacteriocina Bact1 e sua conservação nos filogruppos PG8A e PG2.

*L. rhamnosus* pertence ao gênero *Lacticaseibacillus*, um grupo heterogêneo recentemente descrito, possivelmente abrigando subgrupos específicos adaptados a diferentes habitats ecológicos (Zheng et al., 2020). Embora *Lacticaseibacillus* compreenda 19 espécies, apenas três delas estão altamente representadas no banco de dados RefSeq: *L. casei*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus*. Utilizando todos os genomas de *Lacticaseibacillus* disponíveis no RefSeq, obtivemos 254 genomas de *L. casei*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus* que nos permitiram visualizar uma distinção clara entre espécies usando a distância Mash (uma aproximação rápida

de ANI) juntamente com a presença de intra-aglomerados de espécies em *L. paracasei* e *L. rhamnosus*. A diversidade genômica dentro de *L. paracasei* inclui duas subespécies bem descritas, *L. paracasei* subsp. *tolerans* e *L. paracasei* subsp. *paracasei* (Huang *et al.*, 2018), enquanto nenhum foi publicado validamente para *L. rhamnosus*.

As cepas de *L. rhamnosus* originaram-se de uma ampla gama de nichos ecológicos, desde produtos lácteos fermentados até tecidos animais e humanos. Ceapa e colaboradores (2016) sequenciaram um conjunto diversificado de 40 cepas de *L. rhamnosus*, obtendo oito cladogramas filogenéticos distintos por agrupamento hierárquico de ortólogos. Curiosamente, também descobrimos oito PGs empregando análise Bayesiana hierárquica da estrutura populacional usando wgMLST de 178 genomas de *L. rhamnosus*. Todos os PGs aqui previstos eram monofiléticos, com exceção do PG8, portanto, mais PGs poderão surgir em análises futuras. Enquanto PG1, PG3 e PG6 exibem comprimentos de ramificação menores, PG2 e PG5 exibiram uma clara distinção intra-cluster, possivelmente indicando que esses subclusters se adaptaram a condições específicas de nicho.

A estrutura populacional de outros lactobacilli revelou que *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* isolado de alimentos lácteos naturalmente fermentados agrupam-se em seis linhagens diferentes, mas todas as cepas de produtos lácteos industriais (ATCC BAA-365, 2038, CNCM I-1519, CNCM I-1632, NBIMCC1273, NBIMCC1381) foram agrupadas na mesma linhagem (Song *et al.*, 2016). Uma abordagem semelhante foi empregada para *Lacticaseibacillus casei* (Bao *et al.*, 2016) e *Lactobacillus helveticus* (Sun *et al.*, 2015). Aqui, não conseguimos identificar uma associação de nicho tão clara entre os filogrupos de *L. rhamnosus*, o que pode estar relacionado à ampla gama de fontes de isolamento do nosso conjunto de dados, que destaca a diversidade genômica de *L. rhamnosus*.

A determinação do pan-genoma é uma ferramenta útil para descobrir a diversidade genética de um grupo bacteriano. Nos lactobacilli, estudos de pan-genoma tem sido utilizados para estudar as bactérias probióticas *Lactobacillus gasseri* e *Lactobacillus paragasseri* (Zhou *et al.*, 2020), *Lactobacillus salivarius* (Lee *et al.*, 2017) e *Lactobacillus sakei* (Kim *et al.*, 2020). Apesar da relevância de todos esses dados, a recente criação do gênero *Lacticaseibacillus* sublinhou a heterogeneidade do grupo dos lactobacilli. Anteriormente, estimava-se que o pan-genoma e o genoma core de *L. rhamnosus* abrangessem 4.711 e 2.164 genes, respectivamente, para 40 genomas (Ceapa *et al.*, 2016). Aqui, usando um conjunto de dados maior (n = 178

genomas), descobrimos que o pan-genoma e o genoma core desta bactéria abrangem 11.574 e 1.294 genes, respectivamente. Como o tamanho do pan-genoma é função do número de genomas utilizados para análise (Golicz *et al.*, 2020), essa variação é esperada.

Muitos efeitos probióticos foram relatados para cepas distintas de *L. rhamnosus*, no entanto, poucos genes que codificam as moléculas efetoras para os efeitos probióticos foram claramente identificados (Lebeer *et al.*, 2018). Uma das moléculas efetoras probióticas mais estudadas de *L. rhamnosus* é o pili SpaCBA, que demonstrou ser fundamental para a adesão ao muco humano e ao epitélio intestinal (Lebeer *et al.*, 2012), modular as interações imunorreguladoras com monócitos e células dendríticas (Vargas *et al.*, 2015), e também promover a adesão às biomoléculas do leite (Guerin *et al.*, 2018). Apesar desta relevância, uma grande triagem da distribuição *spaCBA-srtCI* entre cepas de *L. rhamnosus* ainda não foi realizada, preenchemos essa lacuna identificando 44 genomas que abrigam o operon *spaCBA-srtCI* completo. A falta de conservação de *spaCBA-srtCI* em um filogruppo específico apoia a aquisição deste gene por transferência horizontal de genes, como sugerido anteriormente (Douillard *et al.*, 2013, 2016).

Uma das principais preocupações em relação aos efeitos probióticos é se estes podem ser sustentados ao longo de gerações bacterianas. Por meio da evolução experimental, foi demonstrado que o fenótipo SpaCBA de *L. rhamnosus* GG é sustentado em condições livres de estresse, no entanto, os sais biliares ou o estresse de cisalhamento podem ativar elementos da sequência de inserção (IS) que promovem a exclusão de grandes sequências cromossômicas, levando à perda de *spaCBA-srtCI* (Douillard *et al.*, 2016). Aqui analisamos quatro genomas distintos de *L. rhamnosus* GG, todos abrigando a estrutura completa do operon, corroborando que esse operon é mantido ao longo das gerações. Outro operon *spaFED-srtC2* relacionado à adesão que foi encontrado em algumas cepas de *L. rhamnosus*, incluindo GG (Martin *et al.*, 2019, Rasinkangas *et al.*, 2020), está de fato presente no genoma core de *L. rhamnosus*, o que significa que este operon é compartilhado por todas as cepas desta espécie.

As bacteriocinas podem ser consideradas moléculas efetoras probióticas (Hegarty *et al.*, 2016), apesar disso, uma grande pesquisa de bacteriocinas em lactobacilli encontrou apenas uma cepa de *L. rhamnosus* produtora de bacteriocina (Collins *et al.*, 2017). No entanto, novas ferramentas de predição nos permitiram realizar a primeira triagem aprofundada de bacteriocinas em *L. rhamnosus*, descobrindo um cluster de bacteriocina de classe II amplamente



conservado (Bact2), compreendendo genes altamente semelhantes a LSEI\_2386, enterocina X de cadeia beta e carnocina CP52.

Embora sejam necessários mais estudos de caracterização para confirmar esta identificação, uma organização semelhante de agrupamento de bacteriocinas foi relatada para *L. paracasei* SD-1 (Surachat *et al.*, 2017). Esses genes também foram encontrados em vários lactobacilli associados a queijos, incluindo *L. rhamnosus* (Gontijo *et al.*, 2020). LSEI\_2386 é um suposto peptídeo de ferormônio que possui atividade bactericida contra *Listeria* spp. (Kuo *et al.*, 2013). A enterocina X $\beta$  individual (sem sua contraparte X $\alpha$ ) exibiu estreito espectro, com atividade antibacteriana fraca a moderada (Hu *et al.*, 2010). Por fim, a carnocina CP52 foi identificada em *Carnobacterium piscicola* CP5 isolada de queijo curado com mofo, esta molécula exibiu atividade antilisterial (Herbin *et al.*, 1997) e foi semelhante à carnobacteriocina B2 descrita pela primeira vez em *C. maltaromaticum* LV17B (Jacquet *et al.*, 2012).

Garvieacina Q é uma bacteriocina de classe IIb que foi purificada e caracterizada em *L. garvieae* BCC 43.578 (Tosukhowong *et al.*, 2012) e IPLA 31.405 (Florez *et al.*, 2012). O principal agrupamento de bacteriocinas compreende um operon de quatro genes constituído pelo *garQ* / *garI*, flanqueado por dois genes codificadores de proteínas transportadoras (Florez *et al.*, 2012). Conseguimos confirmar que os dois genes centrais da garvieacina Q, que codificam tanto o peptídeo antimicrobiano, quanto a proteína de imunidade, são compartilhados por todas as cepas do PG8A e um subgrupo dentro do PG2. Esta distribuição peculiar de Bact1 (*garQ* / *garI*) pode indicar uma associação de nicho. Curiosamente, os dois subgrupos bem definidos de PG2 possuem *spaCBA-srtC1* ou Bact1, contudo a correlação entre essas duas características genômicas, ainda precisa ser investigada.

#### 4. CONCLUSÕES

Identificamos que a população de *L. rhamnosus* compreende oito PGs. Também mostramos a distribuição dos genes que codificam Spa em todas as cepas. Embora *spaFED - srtC2* esteja presente no genoma core de *L. rhamnosus*, *spaCBA - srtC1* é menos prevalente e encontrado principalmente no PG1 e em um subgrupo PG2. Também revelamos a diversidade de bacteriocinas em toda a espécie, evidenciando que as cepas PG2 possuem *spaCBA - srtC1* ou Bact1. No total, nossas descobertas trazem à luz a diversidade genômica intraespécie de uma bactéria consumida mundialmente, juntamente com seus genes relacionados a benefícios,

destacando o papel das ferramentas genômicas no estudo, avaliação e desenvolvimento de probióticos de bactérias vivas.

### Disponibilidade de Dados e Materiais

Todos os genomas estão disponíveis publicamente através do NCBI – RefSeq.

### Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Super (CAPES) pela bolsa de doutorado da LDS, à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de pós-doutorado do FPM, e ao Conselho Nacional de Pesquisa Científica (CNPq) pela bolsa de pesquisa da ACMA.

### Contribuição dos Autores

Lorena Dutra-Silva: conceitualização, escrita - rascunho original, metodologia e investigação. Filipe Pereira Matteoli: escrita – rascunho final, metodologia, curagem dos dados, investigação e visualização. Ana Carolina Maisonnave Arisi: conceitualização, supervisão, e escrita – revisão e edição.

### Informação Suplementar

As informações suplementares estão disponíveis no site da publicação em DOI: 10.1007/s12602-021-09868-3.

## INFORMAÇÃO DE APOIO SUPLEMENTAR

Tabela S1 - Distribuição de *spaCBA-srtC1* em *Lactocaseibacillus rhamnosus*.

número	accession	filogruppo	cepa	fonte de isolamento	<i>spaCBA-srtC1</i>
1	GCF_000011045	1	GG 2016	Microbiota humana	1
2	GCF_000026505	1	GG 2013	Microbiota humana	1
3	GCF_000026525	6	Lc 705	Produto	0
4	GCF_000160175	6	LMS2-1	Microbiota humana	1
5	GCF_000173255	2	HN001	Produto	0
6	GCF_000233755	6	ATCC 8530	Produto	0
7	GCF_000235785	3	R0011	Produto	0
8	GCF_000235865	3	ATCC 21052	Microbiota humana	0

9	GCF_000311945	4	LRHMDP2	Microbiota humana	0
10	GCF_000311965	4	LRHMDP3	Microbiota humana	0
11	GCF_000418475	3	LOCK900	Microbiota humana	0
12	GCF_000418495	6	LOCK908	Microbiota humana	0
13	GCF_000508405	8	LR231	Microbiota humana	0
14	GCF_000699985	6	51B	Microbiota humana	0
15	GCF_000712495	2	E800	Microbiota humana	1
16	GCF_000712505	1	PEL5	Microbiota humana	0
17	GCF_000712515	1	PEL6	Microbiota humana	0
18	GCF_000743075	2	24	Microbiota humana	0
19	GCF_000784375	8	L34	Microbiota humana	0
20	GCF_000784395	8	L35	Microbiota humana	0
21	GCF_000784405	8	L31	Microbiota humana	0
22	GCF_000801045	5	116	Microbiota humana	0
23	GCF_000814485	7	308	Microbiota humana	1
24	GCF_000932035	3	CLS17	Microbiota humana	0
25	GCF_001005625	6	CNCM-I-3698	Microbiota animal	0
26	GCF_001044405	7	40f	Microbiota humana	1
27	GCF_001044415	1	313	Microbiota humana	0
28	GCF_001062885	2	186_LRHA	Microbiota humana	1
29	GCF_001062955	2	214_LRHA	Microbiota humana	0
30	GCF_001063655	6	526_LRHA	Microbiota humana	1
31	GCF_001064515	5	319_LRHA	Microbiota humana	0
32	GCF_001064785	2	390_LRHA	Microbiota humana	0
33	GCF_001065365	6	541_LRHA	Microbiota humana	0
34	GCF_001066715	6	870_LRHA	Microbiota humana	0
35	GCF_001066975	4	699_LRHA	Microbiota humana	0
36	GCF_001067025	4	708_LRHA	Microbiota humana	0
37	GCF_001067215	6	769_LRHA	Microbiota humana	0
38	GCF_001067335	5	784_LRHA	Microbiota humana	0
39	GCF_001067625	5	893_LRHA	Microbiota humana	1
40	GCF_001067885	6	906_LRHA	Microbiota humana	1
41	GCF_001068015	8	979_LRHA	Microbiota humana	1
42	GCF_001068045	6	988_LRHA	Microbiota humana	0
43	GCF_001068195	6	943_LRHA	Microbiota humana	1
44	GCF_001068215	8	944_LRHA	Microbiota humana	0
45	GCF_001368735	7	BPL15	Ausente	0
46	GCF_001435405	6	DSM 20021	Ausente	0
47	GCF_001590655	6	ASCC 290	Ausente	0
48	GCF_001645615	7	R19-3	Microbiota humana	0
49	GCF_001656535	1	Lrh8	Microbiota humana	0
50	GCF_001656545	1	Lrh32	Microbiota humana	1
51	GCF_001656575	7	Lrh31	Microbiota humana	1
52	GCF_001656605	6	Lrh26	Microbiota humana	0
53	GCF_001656635	6	Lrh22	Microbiota humana	0
54	GCF_001656655	8	Lrh24	Microbiota humana	0

55	GCF_001656675	6	Lrh20	Microbiota humana	0
56	GCF_001656685	5	Lrh19	Microbiota humana	1
57	GCF_001656715	6	Lrh15	Microbiota humana	0
58	GCF_001656735	5	Lrh11	Microbiota humana	0
59	GCF_001656765	5	Lrh34	Laticínio	1
60	GCF_001656785	1	Lrh9	Microbiota humana	0
61	GCF_001656815	1	Lrh7	Microbiota humana	0
62	GCF_001656835	8	Lrh6	Microbiota humana	0
63	GCF_001656895	6	Lrh30	Microbiota humana	0
64	GCF_001656925	2	Lrh28	Microbiota humana	1
65	GCF_001656945	8	Lrh27	Microbiota humana	0
66	GCF_001656975	6	Lrh25	Laticínio	0
67	GCF_001656995	6	Lrh21	Microbiota humana	0
68	GCF_001657055	1	Lrh18	Microbiota humana	1
69	GCF_001657075	1	Lrh17	Microbiota humana	1
70	GCF_001657085	1	Lrh16	Ausente	1
71	GCF_001657115	1	Lrh14	Human_Microbiota	0
72	GCF_001657135	2	Lrh13	Human_Microbiota	1
73	GCF_001657165	3	Lrh10	Laticínio	0
74	GCF_001657205	6	Lrh42	Ausente	0
75	GCF_001756565	1	HCT70	Laticínio	1
76	GCF_001807635	3	HMSC17G08	Microbiota humana	0
77	GCF_001809485	8	HMSC072E07	Microbiota humana	0
78	GCF_001809645	5	HMSC068B07	Microbiota humana	1
79	GCF_001809765	5	HMSC064F12	Microbiota humana	1
80	GCF_001809975	4	HMSC077C11	Microbiota humana	0
81	GCF_001810115	5	HMSC078F07	Microbiota humana	0
82	GCF_001812155	2	HMSC066G01	Microbiota humana	0
83	GCF_001812685	6	HMSC061B07	Microbiota humana	0
84	GCF_001813825	2	HMSC073B09	Microbiota humana	1
85	GCF_001814335	8	HMSC075D02	Microbiota humana	0
86	GCF_001814405	7	HMSC056D05	Microbiota humana	0
87	GCF_001815435	5	HMSC073D04	Microbiota humana	1
88	GCF_001831215	6	ASCC 3018	Laticínio	0
89	GCF_001831225	7	ASCC 3016	Laticínio	1
90	GCF_001831235	3	ASCC 3029	Laticínio	0
91	GCF_001831275	6	ASCC 1521	Laticínio	0
92	GCF_001981725	1	RI-004	Ausente	1
93	GCF_001988935	8	BFE5264	Laticínio	0
94	GCF_001991035	8	L156.4	Microbiota animal	0
95	GCF_002027355	6	R709	Laticínio	0
96	GCF_002076955	3	Pen	Microbiota humana	0
97	GCF_002103155	1	Lrh38	Microbiota humana	0
98	GCF_002103185	6	Lrh47	Microbiota humana	0
99	GCF_002103215	1	Lrh46	Microbiota humana	1
100	GCF_002158925	1	4B15	Microbiota humana	1

101	GCF_002238035	3	IBL027	Microbiota humana	0
102	GCF_002286235	5	LR5	Microbiota humana	0
103	GCF_002287945	2	DSM 14870	Microbiota humana	1
104	GCF_002406705	3	B1	Produto	0
105	GCF_002406715	2	P5	Produto	0
106	GCF_002406745	2	P4	Produto	0
107	GCF_002406795	2	P1	Produto	0
108	GCF_002762445	6	GR-1	Produto	0
109	GCF_002848015	5	UMB0004	Microbiota humana	0
110	GCF_002849515	6	NRRL B-442	Ausente	0
111	GCF_002960215	6	SCT-10-10-60	Microbiota humana	0
112	GCF_003046115	5	LR2	Produto	0
113	GCF_003052925	3	DS18_11	Produto	0
114	GCF_003052945	6	DS13_11	Produto	0
115	GCF_003052965	1	DS4_11	Produto	1
116	GCF_003052985	3	DS3_11	Produto	0
117	GCF_003061565	6	DS17_11	Produto	0
118	GCF_003061605	6	DS22_11	Produto	0
119	GCF_003061625	3	DS9_11	Produto	0
120	GCF_003061645	6	DS15_11	Produto	0
121	GCF_003061665	3	DS12_11	Produto	0
122	GCF_003061705	6	DS14_11	Produto	0
123	GCF_003129615	6	TMC3115	Laticínio	0
124	GCF_003129645	6	LR863	Laticínio	0
125	GCF_003353455	1	GG_2018	Microbiota humana	1
126	GCF_003433395	6	ATCC11443	Ausente	0
127	GCF_003573615	3	ARJD	Laticínio	0
128	GCF_004010975	1	LR-B1	Microbiota humana	1
129	GCF_004122925	8	5-1.	Laticínio	0
130	GCF_004125395	1	LR-B2	Microbiota humana	1
131	GCF_004125455	1	LR-CVC	Microbiota humana	1
132	GCF_004125465	1	<b>LR-GG-MoProbi</b>	Microbiota humana	1
133	GCF_004125475	1	LR-S	Microbiota humana	1
134	GCF_004167055	6	co_0103	Microbiota humana	0
135	GCF_004798455	6	UBLR-58	Produto	0
136	GCF_005864245	8	FAM 20558	Laticínio	0
137	GCF_006151905	5	10.320	Produto	0
138	GCF_007990855	6	NBRC 3425	Ausente	0
139	GCF_008017355	5	Vahe	Microbiota humana	0
140	GCF_008727835	8	hsryfm 1301	Microbiota humana	1
141	GCF_008831425	1	BIO6870	Microbiota humana	1
142	GCF_009429065	8	IDCC 3201	Microbiota humana	0
143	GCF_009679255	6	BIOML-A10	Microbiota humana	0
144	GCF_009679265	6	BIOML-A9	Microbiota humana	0
145	GCF_009679295	6	BIOML-A8	Microbiota humana	0
146	GCF_009679305	6	BIOML-A7	Microbiota humana	0

147	GCF_009679335	6	BIOML-A4	Microbiota humana	0
148	GCF_009679345	1	BIOML-A5	Microbiota humana	0
149	GCF_009679355	6	BIOML-A6	Microbiota humana	0
150	GCF_009679395	6	BIOML-A3	Microbiota humana	0
151	GCF_009679405	6	BIOML-A2	Microbiota humana	0
152	GCF_009720565	6	BIO5326	Microbiota humana	0
153	GCF_009742715	6	LR_AVK	Laticínio	0
154	GCF_009805825	6	Lrh40	Microbiota humana	0
155	GCF_013167115	3	LV108	Microbiota humana	0
156	GCF_013377685	8	QC	Microbiota humana	0
157	GCF_013425545	6	AMC0709	Microbiota humana	0
158	GCF_013425555	6	AMC0713	Microbiota humana	1
159	GCF_013425565	6	AMC0707	Microbiota humana	0
160	GCF_013425605	6	AMC0720	Microbiota humana	0
161	GCF_013425615	6	AMC0710	Microbiota humana	0
162	GCF_013425645	6	AMC0716	Microbiota humana	0
163	GCF_013425655	6	AMC0714	Microbiota humana	0
164	GCF_013425665	6	AMC0722	Microbiota humana	0
165	GCF_013425725	6	AMC0712	Microbiota humana	0
166	GCF_013425735	6	AMC0721	Microbiota humana	0
167	GCF_013425775	6	AMC0706	Microbiota humana	0
168	GCF_014155845	8	DPC 7102	Laticínio	1
169	GCF_014212185	3	CBC-LR1	Laticínio	0
170	GCF_900070175	7	BPL5	Microbiota humana	0
171	GCF_900604925	6	GR-1	Microbiota humana	0
172	GCF_900636875	6	NCTC13710	Ausente	0
173	GCF_900636965	6	NCTC13764	Ausente	0
174	GCF_901830405	1	AMBR1	Microbiota humana	0
175	GCF_901971785	6	INIA P344	Microbiota humana	1
176	GCF_901971795	6	INIA P540	Microbiota humana	0
177	GCF_902166035	6	4928STDY7387 919	Microbiota humana	0
178	GCF_902381635	1	MGYG-HGUT- 0129	Microbiota humana	1

### **CAPÍTULO III**

#### **CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA ATIVIDADE BACTERIOCINOGÊNICA DE *LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS* HN001**

Lorena Dutra-Silva<sup>1</sup>, Filipe P. Matteoli<sup>2</sup>, Ana Carolina Maisonnave Arisi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Food Science and Technology Department, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

<sup>2</sup> Laboratory of Microbial Bioinformatics, Faculty of Sciences – São Paulo State University – Unesp, Bauru, SP, Brazil.

## RESUMO

Os genes *garQ* e *garI*, responsáveis pela síntese da bacteriocina Garvieacina Q estão presentes no genoma de *Lacticaseibacillus rhamnosus* HN001 e em outros doze genomas de cepas filogeneticamente correlacionadas desta espécie. Entretanto, pouco ainda se sabe sobre a presença de outros genes que participam da síntese de proteínas de transporte e processamento da bacteriocina GarQ, como *garC* e *garD*. Analogamente, não há na literatura relatos sobre a produção e os efeitos inibitórios por esta bacteriocina ao ser produzida por *L. rhamnosus*. Assim, este trabalho buscou confirmar a taxonomia da cepa adquirida e a presença dos genes *garQ* e *garI* por meio de abordagens moleculares. Abordagens *in silico* também foram realizadas associadamente com testes de inibição *in vitro*. A cepa probiótica *L. rhamnosus* HN001 teve sua classificação taxonômica confirmada, bem como a presença do operon *garQI*, o qual foi submetido a amplificação. O sequenciamento do amplicon *garQI* e sua posterior análise confirmaram que o fragmento se trata da região *garQI*. Análises *in silico* revelaram que tanto *L. rhamnosus* HN001 quanto as demais doze cepas possuidoras de *garQI* possuem os genes *garCD*. Entretanto, os testes de inibição *in vitro* não foram eficazes em revelar efeitos inibitórios do sobrenadante de cultivo sobre as cepas indicadoras *L. monocytogenes* e *E. coli* ATCC 25922. Este trabalho constitui a etapa inicial na elucidação dos parâmetros envolvidos na síntese, secreção e atividade de Garvieacina Q por *L. rhamnosus* HN001.

## 1. INTRODUÇÃO

A contínua emergência de resistência a antimicrobianos acrescida da lenta descoberta de novas classes de antibióticos são consideradas importantes questões de saúde pública globais, principalmente nos países desenvolvidos (Soltani *et al.*, 2021). No que tange a emergência de cepas resistentes a antimicrobianos, a exposição prolongada a esses fármacos permitiu aos patógenos adaptarem-se por meio do desenvolvimento de mecanismos moleculares classe-específicos, frequentemente codificados por elementos gênicos móveis (e.g. plasmídeos) (Sánchez-Osuna *et al.*, 2023). Tal mobilidade confere a esses genes de resistência a antibióticos ampla dispersão, principalmente em decorrência da contaminação de solos e águas derivadas do tratamento profilático de animais envolvidos na produção de alimentos (Ma *et al.*, 2021).

As múltiplas questões envolvendo a cadeia produtiva de alimentos despertaram a atenção dos consumidores, que almejam produtos mais frescos e com menor conteúdo de



conservantes (Agriopoulou *et al.*, 2020). Esse novo mercado carece de alternativas aos antimicrobianos e conservantes tradicionais. Nesse contexto, a identificação e caracterização de bacteriocinas despertou o interesse nessas moléculas tanto como promissores aditivos, quanto na atuação direta como agentes terapêuticos (Soltani *et al.*, 2021). Esses peptídeos ou proteínas com ação antimicrobiana são produzidos por bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas, e podem ter restrito (McCaughey *et al.*, 2016), ou amplo espectro de ação (Meng *et al.*, 2021). Múltiplas bacteriocinas já foram reportadas como eficazes na conservação de diferentes matrizes alimentares, tais como: frutas e vegetais frescos (Ramos *et al.*, 2020; Tumbarski *et al.*, 2020), leite e queijo (Meng *et al.*, 2021), pescados (Nayak *et al.*, 2022), produtos cárneos (Khorshidian *et al.*, 2021), entre outros.

*Lactocaseibacillus rhamnosus* é uma bactéria Gram-positiva, com cepas probióticas, considerada segura devido ao status de “Geralmente Reconhecido como Seguro” (GRAS) emitido pela FDA dos EUA (Zhao *et al.*, 2023). Seu isolamento se deu pela primeira vez, a partir do intestino humano (Chen *et al.*, 2023) e ao longo do tempo, diferentes cepas foram isoladas de demais partes do corpo (Chervinets *et al.*, 2018; De Boeck *et al.*, 2020; Kant *et al.*, 2014; Petrova *et al.*, 2018), demonstrando uma estreita relação desta espécie com o ser humano em variados sítios anatômicos. Devido a frequência de cepas de *L. rhamnosus* no microbioma humano, buscas por novas bacteriocinas produzidas por esta espécie apresentam uma perspectiva promissora, uma vez que esses peptídeos nativos podem ser substitutos mais seguros aos antimicrobianos e conservantes químicos tradicionais de alimentos (Srinivasan *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2021).

Em *L. rhamnosus*, foi demonstrada a síntese de bacteriocinas, como a rhamnosina A em *L. rhamnosus* cepa 68 (Dimitrijević *et al.*, 2009), a bacteriocina 1.0320 em *L. rhamnosus* cepa 1.0320 (Xu *et al.*, 2021), além de bacteriocinas com atividade antibiofilme mesmo em baixas concentrações (Chen *et al.*, 2023; Ibarra-Martínez *et al.*, 2022). Ensaios *in-vitro* com uma nova bacteriocina, cuja produção é realizada por *L. rhamnosus* isolada de amostras de suco fermentado, demonstraram amplo espectro de atividade contra patógenos de origem alimentar, redução significativa da viabilidade celular desses patógenos, além de inibição da formação de seus biofilmes (Chen *et al.*, 2023). De maneira semelhante, Wei e colaboradores (2022), purificaram parcialmente a bacteriocina XN2 de *L. rhamnosus* XN2 proveniente de iogurte de iaque, que apresentou amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-positivas e *E. coli*. Além disso, quando aplicada em concentrações sub-letais, a bacteriocina demonstrou ser capaz

de reduzir a formação de biofilme, interferindo com os níveis transcricionais do gene *luxS*, que codifica a molécula sinal (autoindutor 2) do sistema *quorum sensing* de *S. aureus*.

Recentemente encontramos em *L. rhamnosus* uma bacteriocina da classe IId, denominada Garvieacina Q que, até o momento, ainda não havia sido descrita dentro do gênero cuja a espécie pertence (Dutra-Silva *et al.*, 2021). Para tal, a detecção foi realizada com o auxílio do banco de dados público BAGEL4 (Van Heel *et al.*, 2018), confirmando a presença de um operon contendo os genes *garQI*, o primeiro codifica a bacteriocina Garvieacina Q (GarQ) e o segundo seu respectivo peptídeo de imunidade GarI nas cepas BFE5264, IDCC3201, Lrh6, 979-LRHA, hsryfm1301, HMSC075D02, P1, P4, P5, HN001, 390-LRHA, HMSC066G01 e 214-LRHA de *L. rhamnosus*, onde o operon encontra-se conservado.

A utilização de ferramentas *in silico* na prospecção de bacteriocinas cada vez mais se consolida como uma alternativa viável, pela eficácia dos resultados obtidos e abundância de genomas disponíveis. Estas metodologias são alternativas vantajosas às buscas laboratoriais tradicionais, que podem ser dispendiosas e demoradas. Banco de dados como o BAGEL (Bacteriocin Genome Mining Tool) foram criados para identificar agrupamentos de genes bacterianos responsáveis pela biossíntese de bacteriocinas. Além de analisar essas sequências de DNA específicas, esta ferramenta classifica, caracteriza, prevê a funcionalidade dessas moléculas e compara seu posicionamento em diferentes genomas bacterianos (Van Heel *et al.*, 2018). Assim, os servidores web de mineração simplificam processos auxiliando nas investigações de cepas bacteriocinogênicas e na prospecção de seus peptídeos.

GarQ é uma bacteriocina da subclasse IId que possui 70 aminoácidos, contendo um peptídeo líder de 20 aminoácidos, o qual é clivado no sítio Gly-Gly para gerar um peptídeo maduro GarQ de 5.339 Da (Tosukhowong *et al.*, 2012). A estrutura do operon biossintético de uma Garvieacina-like de *Lactococcus petauri* B1726 foi elucidada através de análises *in silico*, revelando que a bacteriocina GarQ é codificada por um operon constituído pelos genes *garQ* (que codifica o peptídeo Garvieacina Q), *garI* (que codifica uma proteína putativa de imunidade), além dos genes *garC*, e *garD* (que codificam proteínas transportadoras putativas). Ademais, foi demonstrado que os genes *garQICD*, são responsáveis pela biossíntese e secreção do peptídeo GarQ (Desiderato *et al.*, 2022). No que se refere a seu espectro inibitório, GarQ possui ampla atividade antibacteriana sendo ativo contra diversas espécies dos gêneros *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Pediococcus*, além de possuir atividade

inibitória contra *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 e outras cepas de *L. garvieae* (Tymoszevska *et al.*, 2017).

Aspectos do modo de ação de GarQ demonstram que sua atividade antimicrobiana está fortemente ligada a presença das subunidades IIC e IID do sistema de transporte de açúcares da família da manose, Man (PTS Man), como receptores nas células-alvo, promovendo ruptura da integridade da membrana. As análises da confirmação desta atividade testaram diferentes bactérias alvo, algumas sensíveis à GarQ devido a presença do PTS Man, e outras com ausência ou mutação do PTS Man, sendo resistentes (Desiderato *et al.*, 2022; Tymoszevska *et al.*, 2017). Ainda, se sugere que a interação potencial de GarQ e subunidades PTS Man pode ser prevista por análises *in silico* e que tal mecanismo de interação descrito é similar a outros complexos bacteriocina-receptor como o da pediocina – PTS Man (Zhu *et al.*, 2022). Essas descobertas, contribuem para a possibilidade de produção biotecnológica de GarQ recombinante.

Neste contexto, novos microrganismos bacteriocinogênicos e suas bacteriocinas são frequentemente pesquisados e caracterizados com a finalidade de se tornarem alternativas promissoras aos antimicrobianos sintéticos. Ademais, diante da importância tecnológica do grupo Lactobacilli (antigo *Lactobacillus*) e da escassez de pesquisas sobre cepas produtoras de Garvieacina Q dentro deste grupo, este estudo dedicou-se a investigar aspectos moleculares e fisiológicos relativos à ocorrência, conservação, produção, secreção e atividade de GarQ.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Cepas e condições de cultivo e armazenamento

A cepa bacteriana *Lacticaseibacillus rhamnosus* HN001 foi adquirida comercialmente como um suplemento alimentar (NOUVE DA<sup>®</sup>) contendo a cepa devidamente purificada e identificada em conformidade com as regulamentações vigentes da ANVISA. *Lacticaseibacillus casei* INCQS 500006, *Lacticaseibacillus paracasei* CCT 7501 e *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 8014 foram utilizadas como controles negativos para detecção de genes relacionados a espécie *Lacticaseibacillus rhamnosus*. As cepas *L. rhamnosus* GG (LGG), adquirida da Danisco, e *L. rhamnosus* ATCC 7469 foram utilizadas como controles positivos para a mesma análise, bem como controle negativo, somente LGG, para a detecção de genes relacionados a produção de GarQ. Todas as cepas de *Lacticaseibacillus* foram cultivadas em caldo De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) (Merck, Darmstadt, Alemanha),

durante 24 h a 37 °C. *Listeria monocytogenes* Scott A e *Escherichia coli* ATCC 25922 foram usadas como controle negativo e como bactérias indicadoras da atividade antimicrobiana, sendo cultivadas em Trypticase Soy Broth (TSB) (Merck) a 37 °C por 24 horas.

As cepas foram mantidas como estoques congeladas em caldos MRS e TSB contendo 20% (v/v) de glicerol à -80 °C, para as bactérias lácticas e as bactérias indicadoras, respectivamente. Os microrganismos foram recuperados em caldos MRS e TSB, incubados a 37 °C por 24 horas, repetindo este procedimento e após a incubação as culturas foram submetidas a extração de DNA total.

## 2.2 Extração de DNA

Alíquotas de 1,5 mL de culturas bacterianas puras de *L. rhamnosus* HN001 e GG foram centrifugadas a 12.000 x g por 3 minutos a 4 °C, e os sedimentos celulares foram submetidos à extração de DNA total utilizando o PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração de DNA foi estimada em espectrofotômetro a partir de medições em 260 e 280 nm utilizando NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA).

## 2.3 Confirmação da espécie por PCR

As cepas de *L. rhamnosus* foram confirmadas quanto sua identificação por PCR específica da espécie de acordo com o método descrito por Bottari *et al.*, (2017) e Nelios *et al.*, (2022) com modificações. A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 µL com iniciadores direcionados ao gene *mutL*, ou seja, RHfor (5'-GACTTCTCAACCAGCAGCGCAGA-3') e CPRrev (5'-TGCATTTCCCCGCTTTCATGACT-3') como supracitado, utilizando na reação 12,5 µL de PCR master mix 2X (Ludwig Biotecnologia), 1 µM de cada iniciador F/R e 2 µL de DNA molde (10 ng µL<sup>-1</sup>). As amplificações foram realizadas em um termociclador MJ Research, programado para desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 68 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 45 segundos e uma etapa de extensão final a 72 °C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram analisados em cuba de eletroforese (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) em gel de agarose 1,5% em Tris-Borato-EDTA (TBE) 1% corado com SYBR Safe (Invitrogen Life

Technologies) e marcador de 1 Kb (Promega), sendo visualizados por transiluminação UV (Vilber Lourmat, Collégien, França).

#### 2.4. Pesquisa genética do operon *garQI*

##### 2.4.1. Desenho dos oligonucleotídeos específicos para o gene *garQ* e PCR

Para o desenho dos iniciadores específicos para *garQ*, foi obtida a sequência da posição 7331 (50 pb *upstream* ao início do gene LRH\_09920 – *garQ*) até a posição 7974 (50 pb *downstream* do término do gene LRH\_09925 – *garI*) do contig 79 do assembly de *L. rhamnosus* HN001, perfazendo um fragmento de 643 pb. Os iniciadores de PCR foram projetados utilizando o software Primer3Plus (<http://primer3.ut.ee/>) (Untergasser *et al.*, 2007) e as características dos iniciadores (autocomplementaridade e formação de dímeros de iniciadores) foram verificadas com OligoAnalyzer (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>).

Dois iniciadores, *garQFor* (5'-TAATAGGCACGGTCACTGGC-3') e *garQRev* (5'-ATTGTTGCCATTGCTCCACG-3') foram sintetizados junto à IDT (Coralville, IA, EUA). O comprimento esperado do amplicon foi de 433 pb para os genes *garQI* de *L. rhamnosus* HN001.

A otimização dos parâmetros de PCR foi realizada para um volume final de 25 µL de reação, contendo 12,5 µL de PCR master mix 2X (Ludwig Biotecnologia), 0,50 µM de cada primer F/R e 2 µL de DNA molde (10 ng µL<sup>-1</sup>). As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador MJ Research programado para desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, 35 ciclos consistindo de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento por 30 segundos a 55 °C e extensão a 72 °C por 45 segundos. Foi utilizada uma etapa de extensão final a 72 °C por 5 minutos. Os amplicons foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com SYBR Safe (Invitrogen Life Technologies), em tampão de corrida TBE e marcador de 50 pb (Ludwig Biotecnologia).

##### 2.4.2. Purificação e sequenciamento dos produtos de PCR

O produto de PCR obtido pela amplificação do gene *garQ* foi purificado utilizando o kit Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, USA), conforme as instruções do fabricante e armazenado a – 20 °C até seu envio para a ACTGene (Nova Alvorada, RS, Brasil), empresa responsável pelo sequenciamento. Os produtos purificados da PCR foram sequenciados utilizando o método de Sanger e a sequência obtida foi verificada por meio de BLASTn.

## 2.5 Obtenção do sobrenadante livre de células de *L. rhamnosus* HN001

Culturas de *L. rhamnosus* HN001 foram cultivadas em caldo MRS (pH 6,5) durante 12 e 24 horas a 37 °C, após o crescimento, os sobrenadantes livres de células (SLCs) foram obtidos por centrifugação a 13.000 x g a 4 °C, durante 15 minutos. Os SLCs obtidos com as culturas bacterianas de 12 e 24h de cultivo foram divididos em três frações, uma foi neutralizada com NaOH 1N estéril até pH 6,5 e esterilizada por filtração utilizando membrana com tamanho de poro de 0,22 µm (Kasvi, PR, Brasil), e a segunda fração foi primeiramente esterilizada por filtração (0,22 µm) e depois neutralizada com NaOH 1N estéril até pH 6,5, em seguida ambas foram aquecidas a 85 °C por 10 minutos, para inativação enzimática. A terceira fração dos SLCs obtidas não sofreram nenhum tratamento.

## 2.6 Verificação da atividade de inibição do SLC de *L. rhamnosus* HN001

A atividade antibacteriana dos SLCs foi avaliada contra as bactérias indicadoras *E. coli* ATCC 25922 e *L. monocytogenes* através do método de difusão em ágar, descrito por De Marco *et al.* (2022), bem como pelo método de difusão em poços (Kamal *et al.*, 2018), ambos com algumas modificações. As culturas indicadoras frescas, foram preparadas colhendo três a cinco colônias de cada cepa em placas de ágar e suspendendo-as em TSB, em seguida foram incubadas por 2 a 6 horas e frequentemente medidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm até que a densidade óptica equivalente a  $\sim 8 \log_{10}$  UFC mL<sup>-1</sup> fosse alcançada. Diluições seriadas foram realizadas, para que cada tubo com a bactéria indicadora alcançasse 5  $\log_{10}$  UFC mL<sup>-1</sup>. Swabs estéreis foram umedecidos nos tubos de cada bactéria, e então utilizados para espalhar as bactérias indicadoras na superfície de uma placa contendo Tryptone Soya Agar (TSA, Merck) (Kamal *et al.*, 2018).

Para o método de difusão em ágar, alíquotas de 20 µL dos SLCs obtidos nos diferentes sistemas de tratamento mencionados acima, foram adicionadas em quatro pontos equidistantes entre si em placas de petri contendo ágar TSA, previamente inoculadas com 10<sup>5</sup> UFC mL<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes* e em outra placa de TSA previamente inoculadas com 10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> de *E. coli* ATCC 25922. Desta forma, cada sistema de tratamento dos SLCs foi testado contra as diferentes bactérias indicadoras utilizadas. Todas placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas.

Para o método de difusão em poços, alíquotas de 100 µL dos SLCs dos diferentes sistemas de tratamento, foram adicionadas em quatro poços de 8 mm de diâmetro previamente cortados nas placas de TSA inoculadas com 10<sup>5</sup> UFC mL<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes* e nas placas

de TSA inoculadas com  $10^5$  UFC mL<sup>-1</sup> de *E. coli* ATCC 25922. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas.

Como controle negativo foi utilizado caldo MRS estéril. A presença de zonas de inibição ao redor dos poços ou dos pontos preparados nas placas confirmam a presença de atividade antimicrobiana de possível natureza proteica dos SLCs. Os experimentos foram realizados em triplicata.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

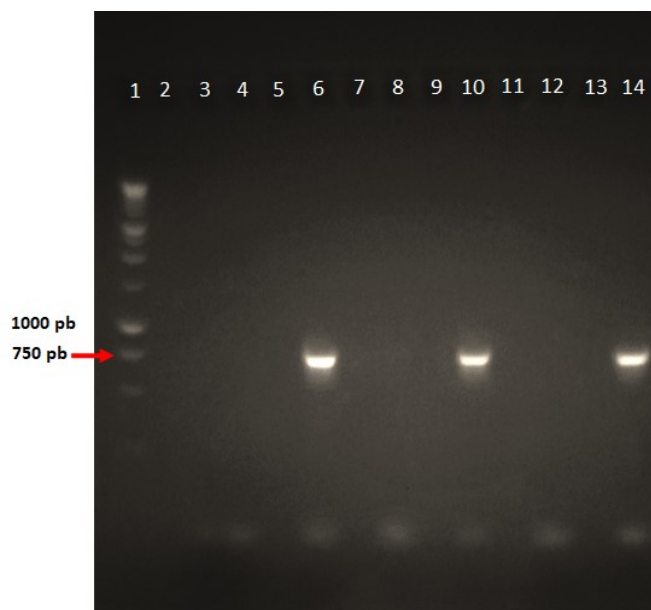
#### 3.1 Confirmação da espécie *L. rhamnosus*

A identificação precisa de espécies específicas, em particular de *L. rhamnosus*, proporciona segurança e eficácia de resultados analíticos nos campos da microbiologia, biotecnologia, ciência dos alimentos, bem como para as indústrias de produtos alimentícios e de suplementos que utilizam dessas espécies de microrganismos em suas formulações.

A espécie *L. rhamnosus* juntamente com as espécies *L. casei* e *L. paracasei*, pertencem ao grupo denominado *Lacticaseibacillus casei* (LCG), cuja a relação filogenética e fenotípica das cepas pertencentes ao grupo é muito próxima (Cui *et al.*, 2021; Hill *et al.*, 2018). Embora exista uma ampla utilização biotecnológica dessas três espécies, devido, principalmente às suas propriedades probióticas, estes microrganismos possuem características muito semelhantes, tornando complexa a diferenciação das bactérias do LCG por métodos fenotípicos e genotípicos convencionais (Cui *et al.*, 2021).

Para auxiliar na diferenciação e identificação de espécies intimamente relacionadas, como, por exemplo, as do grupo *L. casei*, a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) contribui de forma eficiente com a amplificação seletiva de genes de interesse, cujo resultado fornece precisão a um DNA alvo investigado. Neste contexto, utilizamos a PCR para amplificar o gene *mutL* direcionado para a espécie *L. rhamnosus* (Bottari *et al.*, 2017) e posteriormente submetemos os produtos amplificados à análise de eletroforese em gel de agarose 1,5 %, como indicado na Figura 1.

Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% de fragmento do gene *mutL*.



Eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto da PCR do gene *mutL* direcionado à espécie *Lactobacillus rhamnosus*. 1. Marcador 1kb DNA Ladder (Promega); 3. Água; 4. *L. casei*; 6. *L. rhamnosus* HN001; 8: *L. paracasei* CCT 7501; 10: *L. rhamnosus* ATCC 7469; 12: *L. plantarum* ATCC 8014; 14: *L. rhamnosus* GG.

A confirmação molecular foi baseada em iniciadores específicos da espécie *L. rhamnosus* (Bottari *et al.*, 2017) para o grupo *L. casei* e utilizou as cepas *L. rhamnosus* GG, HN001 e ATCC 7469, além de *L. casei* INCQ 500006, *L. paracasei* e *L. plantarum* como as cepas avaliadas. Foi revelado pela análise dos produtos da PCR, através da eletroforese em gel de agarose, a amplificação da banda de 801 pb referentes ao amplicon do gene *mutL* que distingue *L. rhamnosus* das demais espécies analisadas.

Devido a característica “housekeeping” do gene *mutL*, sua utilização como marcador molecular de referência torna-o uma ferramenta útil para análise da diversidade genética de organismos procariotos (Huang *et al.*, 2018). Além da sua conservação, por ser considerado um gene constitutivo de manutenção da função básica das células, o *mutL* repara erros de pareamento de bases no DNA, sendo essencial para a manutenção da estabilidade genômica (Ban *et al.*, 1998). Bottari *et al.*, (2017) em seu trabalho confirma o alto poder discriminatório do *mutL* a nível de espécie em análises de identificação por PCR multiplex para isolados do grupo *L. casei* revelando a biodiversidade intraespecífica existente no grupo.

A PCR para o gene *mutL* foi essencial neste estudo por discriminar a nível de espécie *L. rhamnosus*, dentro de um grupo constituído por *L. casei*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus*, cujas espécies pertencem ao mesmo gênero e, portanto, são considerados estreitamente relacionadas,



contendo algumas das cepas probióticas mais pesquisadas e aplicadas em formulações alimentares (Hill *et al.*, 2018). Embora a importância de muitas cepas contidas neste grupo seja grande, a diferenciação taxonômica das espécies geneticamente relacionadas é contenciosa, principalmente quando baseadas em técnicas microbiológicas clássicas e, por isso abordagens moleculares, como a PCR, são cada vez mais empregadas.

Para discernir relações filogenéticas entre os isolados do grupo *L. casei*, a utilização do gene *mutL* como marcador taxonômico dos genomas das cepas bacterianas intimamente relacionadas, foram também empregadas recentemente por Nelios e colaboradores (2022), confirmando a identificação de novos isolados de *L. rhamnosus* de amostras de salmoura, azeitonas fermentadas e de queijo. Huang *et al.*, (2018), também identificou cepas no grupo *L. casei* nos níveis de espécie e subespécie utilizando métodos com iniciadores baseados nas sequências do gene *mutL* e demais genes, fornecendo resultados com alta resolução de identificação.

### **3.2 Pesquisa genética de bacteriocina GarQ**

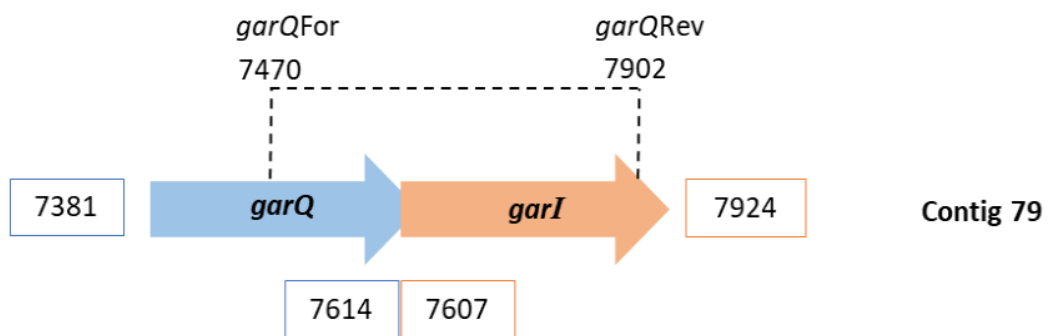
Com a confirmação da espécie *L. rhamnosus* usada neste trabalho, o desenvolvimento de iniciadores específicos para os genes codificantes da bacteriocina GarQ foi realizado. Os iniciadores foram projetados com base em sequências de referência do gene da bacteriocina GarQ em *L. rhamnosus* HN001, utilizando ferramentas de alinhamento e análise de homologia. Após as interações de otimização, obtivemos os iniciadores específicos, demonstrando alta identidade para a sequência alvo do gene da GarQ, além de poder discriminatório contra sequências genômicas não relacionadas.

Em pesquisa prévia, Dutra-Silva e colaboradores (2021), confirmamos a presença do operon contendo os genes *garQI* conservados em apenas treze das 178 cepas de *L. rhamnosus* (BFE5264, IDCC3201, Lrh6, 979-LRHA, hsryfm1301, HMSC075D02, P1, P4, P5, HN001, 390-LRHA, HMSC066G01 e 214-LRHA). Estes dois genes codificam a bacteriocina GarQ e seu respectivo peptídeo de imunidade, tornando as treze cepas citadas possíveis candidatas para esta pesquisa de investigação dos aspectos moleculares e fisiológicos relativos à ocorrência, conservação, produção, e atividade de GarQ.

Para identificar os potenciais agrupamentos de genes para a produção de GarQ, o genoma de *L. rhamnosus* HN001 foi selecionado dentre as trezes cepas que possuíam o operon pesquisado (Dutra-Silva *et al.*, 2021). Com auxílio da ferramenta BAGEL4, foi possível obter

a região de interesse para o desenho dos iniciadores sintetizados (Figura 2). A região para produção de GarQ em *L. rhamnosus* HN001 foi identificada dentro do contig 79, composta pelos genes *garQ* com início a 7381 até 7614 pb e *garI* iniciando em 7607 até 7924 pb. A posição detalhada de hibridização dos iniciadores, nas posições 7470 pb para *garQ*For até 7902 pb para *garQ*Rev, codificando um fragmento genômico de 432 pb, contendo parte dos genes *garQ* e *garI*, responsáveis pela produção de GarQ e sua proteína de imunidade.

Figura 2 - Representação esquemática da região contendo os genes *garQ* e *garI*, hibridização dos oligonucleotídeos.



Genes *garQ* e *garI*. Detalhamento da posição que os genes começam e terminam. Posição do primer de 7470 até 7902 pb, contidos no contig 79.

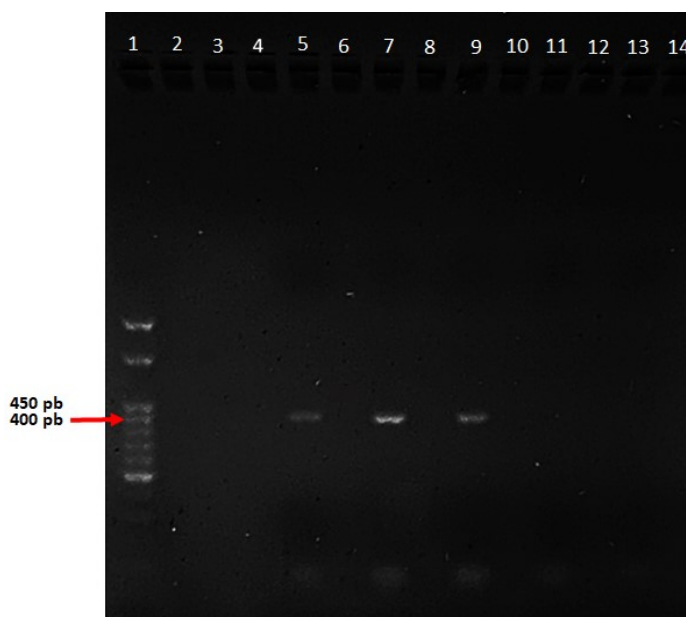
Diversos trabalhos focados na identificação de bacteriocinas utilizaram ensaios dependentes de cultivo, no entanto essas abordagens são demoradas e trabalhosas. Por isso, técnicas de detecção de genes codificadores de peptídeos antimicrobianos a nível genômico são ferramentas em aprimoramento desde os anos 2000 (Nes e Johnsborg, 2004). Neste âmbito, existe a vantagem de se utilizar análises de PCR com iniciadores específicos para detectar genes codificadores de bacteriocinas, como Garvieacina Q, uma vez que essa abordagem fornece um avanço em relação aos métodos tradicionais dependentes de ensaios funcionais, por ser mais sensível, rápida e específica na detecção desses genes.

Com base na literatura, observamos que esta é a primeira pesquisa que utiliza a análise de PCR com iniciadores desenhados para um alinhamento com genes relacionados à síntese da bacteriocina GarQ de *L. rhamnosus* HN001. As sequências obtidas para o par de iniciadores *garQ*For (5'-TAATAGGCACGGTCACTGGC-3') e *garQ*Rev (5'-ATTGTTGCCATTGCTCCACG-3') indicaram, através dos resultados da análise de PCR, que

estes foram capazes de amplificar um fragmento dos genes envolvidos na síntese de Garvieacina Q na cepa *L. rhamnosus* HN001 de forma eficiente e específica (Figura 3).

Foi observada amplificação de banda de 432 pb referente ao gene *garQ* em todas as cepas de *L. rhamnosus* HN001, ainda que utilizadas diferentes extrações de DNA genômico das amostras. O tamanho do amplicon obtido em nosso estudo é consistente com o esperado com base nos iniciadores projetados para a detecção da região *garQI* na cepa mencionada. Usualmente, o tamanho do amplicon deve variar de 100 a 1000 pb (Hyndman e Mitsuhashi 2003; Więckowicz *et al.*, 2011), uma vez que amplicons muito maiores ou muito menores podem não ser eficientemente amplificados e detectados. De forma complementar, o tamanho do amplicon influencia a especificidade da detecção, tamanhos adequados tem maiores possibilidades de corresponder ao gene alvo. Portanto, a análise apresentada nesta pesquisa utiliza iniciadores direcionados à ligação dentro da região de codificação de GarQ em *L. rhamnosus* HN001, permitindo um direcionamento exato.

Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% de gene *garQ* de *L. rhamnosus* HN001.



Eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto da PCR do gene *garQ* de *L. rhamnosus*. Canaleta 1: o marcador 50 pb DNA Ladder (Ludwig Biotecnologia); 5, 7 e 9: diferentes amostras de DNA extraído de *L. rhamnosus* HN001; 11: *L. rhamnosus* GG e 13: água.

De maneira semelhante a análise aqui realizada, Więckowicz *et al.*, (2011) desenvolveu um novo método de PCR utilizando iniciadores projetados com base em alinhamentos específicos, porém para genes codificantes de bacteriocinas classe IIa, destacando a eficiência

da utilidade desses métodos na busca por novas bacteriocinas e produtores de bacteriocinas, especialmente em alimentos.

O sequenciamento de Sanger é considerado uma forma de sequenciamento de primeira geração capaz de gerar reads de até 1500 pb com baixa taxa de erro. Neste trabalho, utilizamos essa estratégia de sequenciamento para confirmar que o produto da PCR decorrente da amplificação mediada pelos primers garQFor e garQRev gerou o fragmento esperado, ou seja, um fragmento contendo uma região entre *garQI* (Figura 2).

A partir da análise do resultado do sequenciamento de Sanger com o iniciador garQFor (Figura S1) a sequência obtida foi cortada em 25 pb no início e em 11 pb no final, originando uma sequência de 370 pb. Analogamente, a sequência obtida com o primer garQRev também precisou ser cortada (Figura S2), para tal, 27 pb foram removidos no início e 11 pb no final da sequência, originando uma sequência de 368 pb.

A partir do alinhamento local e recíproco dos fragmentos, realizado por meio de Blastn, foi possível verificar a alta identidade, confirmando que ambos iniciadores possibilitaram a amplificação, e conseqüente sequenciamento da mesma região (Figura 4).

Figura 4 - Alinhamento local realizado por Blastn entre os fragmentos sequenciados por Sanger obtidos por meio do primer garQFor (Query) e garQRev (Subject).

```

garQFor  CTTTGGGATCAWGGGAAATGGTTgggggggAGCGCCGGA-CATCCGGTCGACAACACTAA
garQRev  CTTTGGGATCATGGGAAATGGTTGGGGGGGAGCGCCGGAGCATCCGGTCGACAACACTAA
garQFor  ACCCATATTAAGGGTGACAAGAAATGGTTAATCGTAAAAATAATTCTCAGTTAAATCAA
garQRev  ACCCATATTAAGGGTGACAAGAAATGGTTAATCGTAAAAATAATTCTCAGTTAAATCAA
garQFor  AGATACTAAGCATGCTATATGATTTTGTGCTTGATCCCAATATCAAAGATCGGGAAAGAA
garQRev  AGATACTAAGCATGCTATATGATTTTGTGCTTGATCCCAATATCAAAGATCGGGAAAGAA
garQFor  AAATTGGACTCATGGCGAAAGCTGACATGGAAAAGGGTCGCTATAATGTAGCTGTACTTA
garQRev  AAATTGGACTCATGGCGAAAGCTGACATGGAAAAGGGTCGCTATAATGTAGCTGKRCTTA
garQFor  ACCGACTCTTATTAGCTTGCAAAGAGAAGCAATGCGTACTGGTTTGTCTCATGATGCTT
garQRev  ACCGACTCTTATTAGCTTGCAAAGAGAAGCAATGCGTRCTGGTTTGTCTCATGATGCTT
garQFor  CAAAACTTTATGACAATTTTCAG 322
garQRev  CAAAACTTTATGACAATTT-CAG 1

```

E value: 4e-167. Identidade: 98%. Tamanho total do alinhamento 322 pb.

Finalmente, a sequência obtida pelo alinhamento (consenso), foi usada como query para um blastx contra o banco de dados não redundante de proteínas (nr), que confirmou os hits

como sendo genes anotados como codificantes da bacteriocina Garvieacina Q e seu respectivo peptídeo de imunidade (Quadro 1). A análise dos hits obtidos evidencia alta identidade e baixo e-value da query (sequência consenso obtida pelo sequenciamento de Sanger a partir dos primers garQFor e garQRev) contra várias sequências de proteínas disponíveis no banco de dados nr e anotadas como proteína de imunidade de Garvieacina (Gar-IM).

Quadro 1 - Busca realizada por meio de Blastx online (query nucleotídica traduzida contra banco de dados de proteínas).

Sequências que produziram alinhamento significativo					
Descrição	Cobertura Query	E-value	Identidade (%)	Tamanho da Subject	Acesso
Unnamed protein product [Lacticaseibacillus rhamnosus]	73%	3e-47	97.47%	105	WP_005687362.1
Gar-IM [Lacticaseibacillus rhamnosus]	73%	1e-45	94.94%	105	WP_070550681.1
Gar-IM [Lacticaseibacillus rhamnosus]	73%	5e-44	92.41%	105	KMO48161.1
Bacteriocin immunity protein [Lacticaseibacillus rhamnosus]	73%	1e-43	92.41%	105	WP_257585650.1
Gar-IM [Lacticaseibacillus rhamnosus]	77%	3e-41	84.34%	111	KMO47511.1
Hypothetical protein Lpp_126_14476 [Lacticaseibacillus paracasei]	73%	6e-37	79.75%	105	EPC72580.1
Gar-IM [Lacticaseibacillus paracasei]	73%	4e-36	78.48%	105	WP_071799120.1
Bacteriocin immunity protein [Lacticaseibacillus paracasei]	73%	6e-36	78.48%	109	WP_123019213.1

A maior parte dos hits foi composta de proteínas de imunidade, o que era esperado, uma vez que o par de iniciadores garQFor e garQRev amplificam uma região maior do gene *garI* do

que do gene *garQ*. Interessantemente, o Blastx revelou que genomas de *L. paracasei* também possuem hits com alta identidade contra a sequência consenso obtida por *garQFor* e *garQRev* de *L. rhamnosus* HN001; permitindo inferir que o operon *garQI* também está presente em alguns genomas de *L. paracasei*.

Segundo Desiderato *et al.*, (2022), o operon funcional de *Lactococcus petauri* apresenta não somente os genes *garQI*, mas também os transportadores *garCD*. Esses quatro genes estão organizados em um operon bicistrônico *garQICD*. Para investigar se essa organização também é encontrada nos treze genomas de *L. rhamnosus* contendo *garQI* (Dutra-Silva *et al.*, 2021), esses treze genomas foram separados em um novo dataset (Quadro 2).

Quadro 2 – Metadados principais sobre os treze genomas de *L. rhamnosus* que contém *garQI*.

Accession	Cluster	Cepa	Fonte	País	Estado do genomas
GCF_000173255	2	HN001	Laticínios	Nova Zelândia	Contig
GCF_001062955	2	214_LRHA	<i>Homo sapiens</i>	EUA	Contig
GCF_001064785	2	390_LRHA	<i>Homo sapiens</i>	EUA	Contig
GCF_001068015	8	979_LRHA	<i>Homo sapiens</i>	EUA	Contig
GCF_001656835	8	Lrh6	<i>Homo sapiens</i>	Holanda	Contig
GCF_001812155	2	HMSC066G01	-	-	Contig
GCF_001814335	8	HMSC075D02	-	-	Contig
GCF_001988935	8	BFE5264	Leite de vaca	Quênia	Completo
GCF_002406715	2	P5	Probiótico comercial	Canadá	Contig
GCF_002406745	2	P4	Probiótico comercial	Canadá	Contig
GCF_002406795	2	P1	Probiótico comercial	Canadá	Contig
GCF_008727835	8	hsryfm 1301	<i>Homo sapiens</i>	China	Completo
GCF_009429065	8	IDCC 3201	Fezes de lactente	Coreia do Sul	Completo

A maior parte dos treze genomas apresenta seu assembly ainda fragmentado (genomas em estado de contig). Três dos genomas estão em estado completo, ou seja, foram montados em apenas um fragmento, contendo o cromossomo circular. Todos os genomas que estão

completos pertencem ao cluster populacional 8 (identificação relativa aos subgrupos da espécie *L. rhamnosus*).

Para detectar a presença e localização dos genes *garCD* nos treze genomas de *L. rhamnosus*, as sequências das proteínas GarC e GarD de *L. petauri* B1726 foram obtidas. Buscas foram realizadas por meio de Blastp local, o que permitiu detectar que todos os treze genomas possuem os genes *garCD*, entretanto esses genes não estão localizados contíguos ao operon *garQI* (Quadro 3), ao contrário do reportado para *L. petauri* B1726, que possui um operon único *garQICD*. É possível notar pela numeração das proteínas que GarQ e GarI são sempre contíguos, tal qual GarC e GarD. Porém, esses dois pares de genes distam entre si.

Quadro 3 - Proteínas identificadas como *garQ*, *garI*, *garC* ou *garD* por meio de blastp local.

Cepa	<i>garQ</i>	<i>garI</i>	<i>garC</i>	<i>garD</i>
HN001	LRH_09920	LRH_09925	LRH_08053	LRH_08058
214_LRHA	00428	00429	02379	02378
390_LRHA	00034	00035	01115	01116
979_LRHA	02821	02822	00725	00724
Lrh6	00372	03373	02018	02019
HMSC066G01	02813	02812	01427	01426
HMSC075D02	00886	00887	01680	01679
BEF5264*	02209	02208	01495	01494
P5	01560	01559	00777	00776
P4	01463	01462	00583	00582
P1	01511	01510	00682	00681
hsryfm 1301*	01364	01365	02052	02053/2054
IDCC 3201*	02174	02173	01448	01447

Genomas com \* são genomas completos. Todos os genomas, exceto *L. rhamnosus* HN001 foram reanotados e a nova predição foi utilizada. Por essa razão, HN001 conserva o prefixo (Locus\_tag) dos genes, gerado pelo depositante no NCBI, no qual cada gene varia 5 unidades.

### 3.3 Verificação da atividade de inibição do sobrenadante livre de células de *L. rhamnosus* HN001

As cepas *L. rhamnosus* HN001 cultivadas nos diferentes tempos de incubação, 12 e 24 horas, forneceram seus respectivos sobrenadante livre de células (SLC), os quais foram

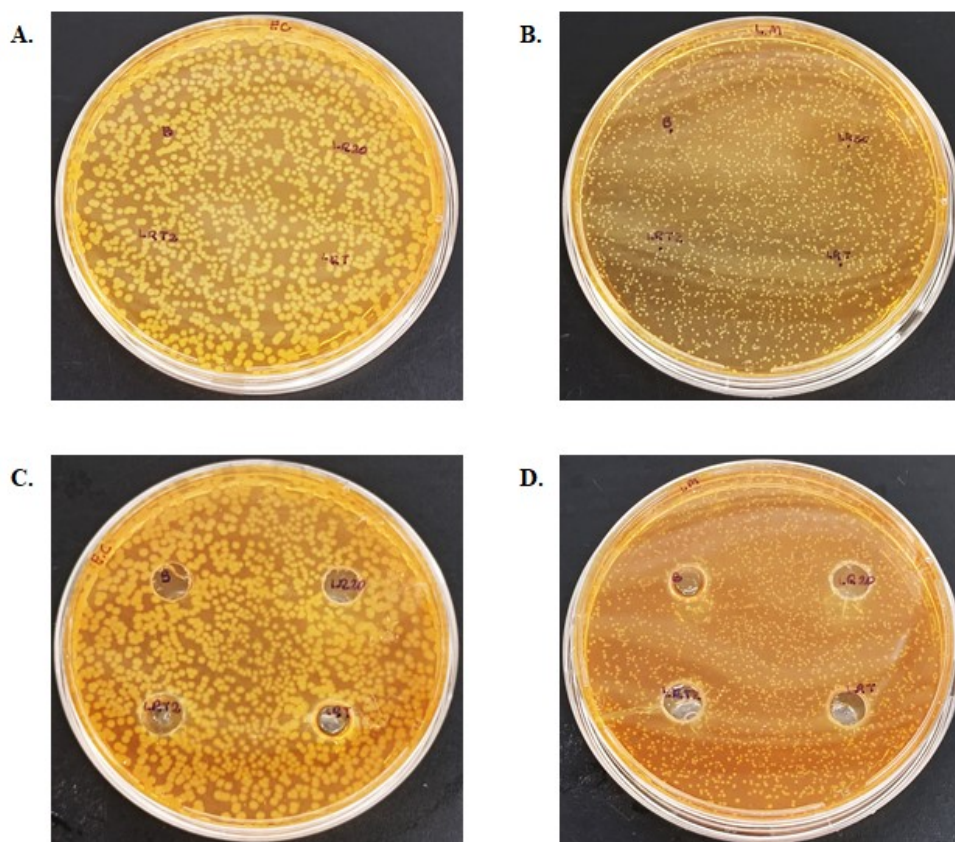
divididos em três frações cada um. Uma fração dos SLCs obtidos não sofreu tratamento algum e as duas outras frações foram submetidas aos tratamentos de neutralização e esterilização por filtração, nesta ordem, ou esterilização por filtração, seguida por neutralização. Posteriormente, essas duas frações dos SLCs foram também aquecidas para inativação de moléculas interferentes. Os diferentes sistemas direcionados às frações dos SLCs foram aplicados com a finalidade de se observar possíveis diferenças presentes nos resultados de inibição.

O método de difusão em ágar foi utilizado para avaliar o efeito antimicrobiano dos SLCs, obtidos nos diferentes sistemas de tratamento mencionados acima, contra as bactérias indicadoras *L. monocytogens* e *E. coli* ATCC 25922. Ambos sistemas de tratamento com modificações nas ordens que foram aplicados nos SLCs de 12 e 24 horas, não apresentaram diferenças em seus resultados de efeito antimicrobiano, inclusive para os SLCs sem tratamento algum. Para todos os casos não foram observadas nenhuma zona de halo de inibição do crescimento das bactérias indicadoras (Figura 5A e 5B).

O método de difusão em poços foi empregado para testar possíveis diferenças na efetividade dos métodos antimicrobianos realizados. Para isto, este método também foi utilizado na avaliação do efeito antimicrobiano dos SLCs obtidos com os diferentes sistemas de tratamento aplicados, contra as mesmas bactérias indicadoras avaliadas. Os resultados observados não apresentaram nenhum efeito antimicrobiano, sendo assim semelhantes aos resultados obtidos para o método de difusão em ágar mencionado anteriormente (Figura 5C e 5D).



Figura 5 – Teste de inibição dos SLCs de *L. rhamnosus* HN001.



Atividade antimicrobiana de SLCs de *L. rhamnosus* HN001 contra *E. coli* ATCC 25922 e *L. monocytogenes* pelos métodos de difusão em ágar (A. e B.) e de difusão em poços (C. e D.). Em A. e C. placas de petri com ágar TSA inoculadas com *E. coli* ATCC 25922, em B. e D. inoculadas com *L. monocytogenes*. Todas as placas contêm em seus quadrantes superiores à esquerda o controle negativo com caldo MRS estéril, quadrantes superiores à direita SLCs tratados primeiramente por filtração e em seguida neutralização, quadrantes inferiores à esquerda contendo SLCs neutralizado e em seguida filtrado, e os quadrantes inferiores à direita contêm SLCs sem tratamento.

Diversas abordagens são utilizadas para a detecção da produção de bacteriocinas baseadas na atividade de inibição do crescimento de uma bactéria indicadora por uma cepa produtora, com a difusão da bacteriocina produzida em meios de cultura sólido ou semi-sólido (Lewus *et al.*, 1991). Os métodos de difusão em ágar e de difusão em poços são dois exemplos de técnicas muito utilizadas para se obter resultados de inibição de crescimento de microrganismos, por serem reprodutíveis, de fácil interpretação e rápidos.

Avaliando a atividade antimicrobiana dos sobrenadantes livres de células de *L. rhamnosus* HN001 por ambos métodos testados, evidenciou-se que as abordagens metodológicas baseadas nas técnicas utilizadas não influenciaram na distinção dos resultados obtidos. Podemos observar, ainda que se excluindo a ação de moléculas interferentes, como

peróxido de hidrogênio e ácidos orgânicos, não foi possível demonstrar zonas de inibição formadas pelos SLCs sobre as bactérias indicadoras. Estes resultados reforçam a importância da otimização de condições de cultura ideais para indução do crescimento bacteriano e da produção das bacteriocinas para se obter a ação das mesmas (Mercado *et al.*, 2022).

As condições ambientais aplicadas no cultivo da bactéria produtora, como meio de cultura, aeração, pH, temperatura, tempo de incubação, concentração de açúcar, componentes e capacidade tamponante do meio, são elementos que afetam a otimização da produção e a efetividade das bacteriocinas frente às bactérias indicadoras (Barman *et al.*, 2018; Mercado *et al.*, 2022).

De Marco *et al.*, (2022), identificou maior e melhor condição de produção de uma substância inibidora semelhante à bacteriocina (BLIS) pelo isolado *L. lactis* LLH20 em caldo MRS suplementado com 1,25% de glicose, a pH 7 e temperatura de crescimento de 32 °C, resultando em um aumento no tamanho da zona de inibição (> 20 mm) para atividade antilisterial. Mortvedt-Abildgaa e colaboradores (1995), observaram que a lactocina S produzida por *Lactobacillus sake* L45 não afetava as células sensíveis à bacteriocina quando os valores de pH do meio estavam acima de seis e que aeração da cultura durante o crescimento de *L. sake* L45 eliminou quase completamente a produção de bacteriocina.

Em suas pesquisas, Desiderato e colaboradores (2022), demonstraram que a produção de GarQ pela cepa recombinante de *C. glutamicum* foi melhorada usando um meio definido e que a produção de GarQ foi mais baixa a 37° C, em comparação com demais temperaturas de 25 e 30° C, para *C. glutamicum* e *L. petauri* B1726, um produtor natural. Isso leva a uma possível explicação da ausência de produção da bacteriocina alvo GarQ no meio de cultivo de *L. rhamnosus* deste trabalho, que foi cultivada a 37°C. Ademais, esse comportamento dependente de temperatura foi observado também em *L. sakei* Lb706, que demonstrou boa produção de sacarina A a 25 e 30° C, mas não a 35°C (Diep *et al.*, 2000). Esses trabalhos corroboram com a hipótese de que a regulação da produção dessas substâncias parece depender da temperatura de cultivo da bactéria produtora.

Em relação ao tempo de crescimento de *L. rhamnosus* HN001 por 12 ou 24 horas em caldo MRS (pH 6,5), a produção de bacteriocina neste trabalho não foi observada, apesar do aumento da turbidez observável no tubo de cultivo bacteriano, que é indicativo do acréscimo de biomassa celular. Embora, a utilização de meios de cultura complexos traga aumento de biomassa celular, com possível aumento da produção de bacteriocinas, é sabido que o maior

conteúdo e diversidade de nutrientes no meio, pode reprimir a expressão e síntese de bacteriocinas (Mercado *et al.*, 2022), além de que o conteúdo de peptídeos dos substratos contidos no meio de cultura pode atuar com indutores ou precursores na biossíntese de bacteriocinas (Motta; Brandelli, 2007). Portanto, a ausência da produção de bacteriocina por *L. rhamnosus* neste trabalho, poderia ser explicada por esses motivos também.

Muitos trabalhos corroboram com o fato de a maioria dos metabólitos secundários como as bacteriocinas podem ser detectados ao final da fase logarítmica do crescimento bacteriano, com o máximo em torno da metade da fase estacionária (Mercado *et al.*, 2022). Para Abdollahi *et al.*, (2018), o início da produção da substância antimicrobiana de *L. lactis* em caldo MRS se deu em oito horas, com maior produção após 14 horas de cultivo, ou seja, em sua fase logarítmica tardia e estacionária. Em contrapartida, Furtado e colaboradores (2009) relataram em seu trabalho, com 14 cepas bacteriocinogênicas de BAL isoladas de leite de cabra e queijos, que a maior produção de bacteriocinas foi registrada durante o início da fase estacionária de crescimento permanecendo estável por pelo menos 24 horas a 30° C.

A produção de bacteriocinas é intrinsecamente relacionada ao genoma da bactéria produtora deste metabólito. Devido às diferenças nos genes que codificam a produção, secreção e imunidade, cada bacteriocina possui estrutura única e diferentes modos de ação, tornando-as alternativas com propriedades diferentes para multiplas aplicações (Sharma *et al.*, 2021).

*L. rhamnosus* HN001 possui todos os componentes genéticos necessários para a síntese, imunidade e secreção da bacteriocina GarQ. Entretanto, sua expressão nas condições aqui aplicadas não foi observada. Cabe destacar que os processos de expressão gênica são complexos e multifatoriais, sendo exigido compreensão ampla e aprofundada de todo mecanismo de expressão gênica para otimizar a biossíntese de uma bacteriocina alvo.

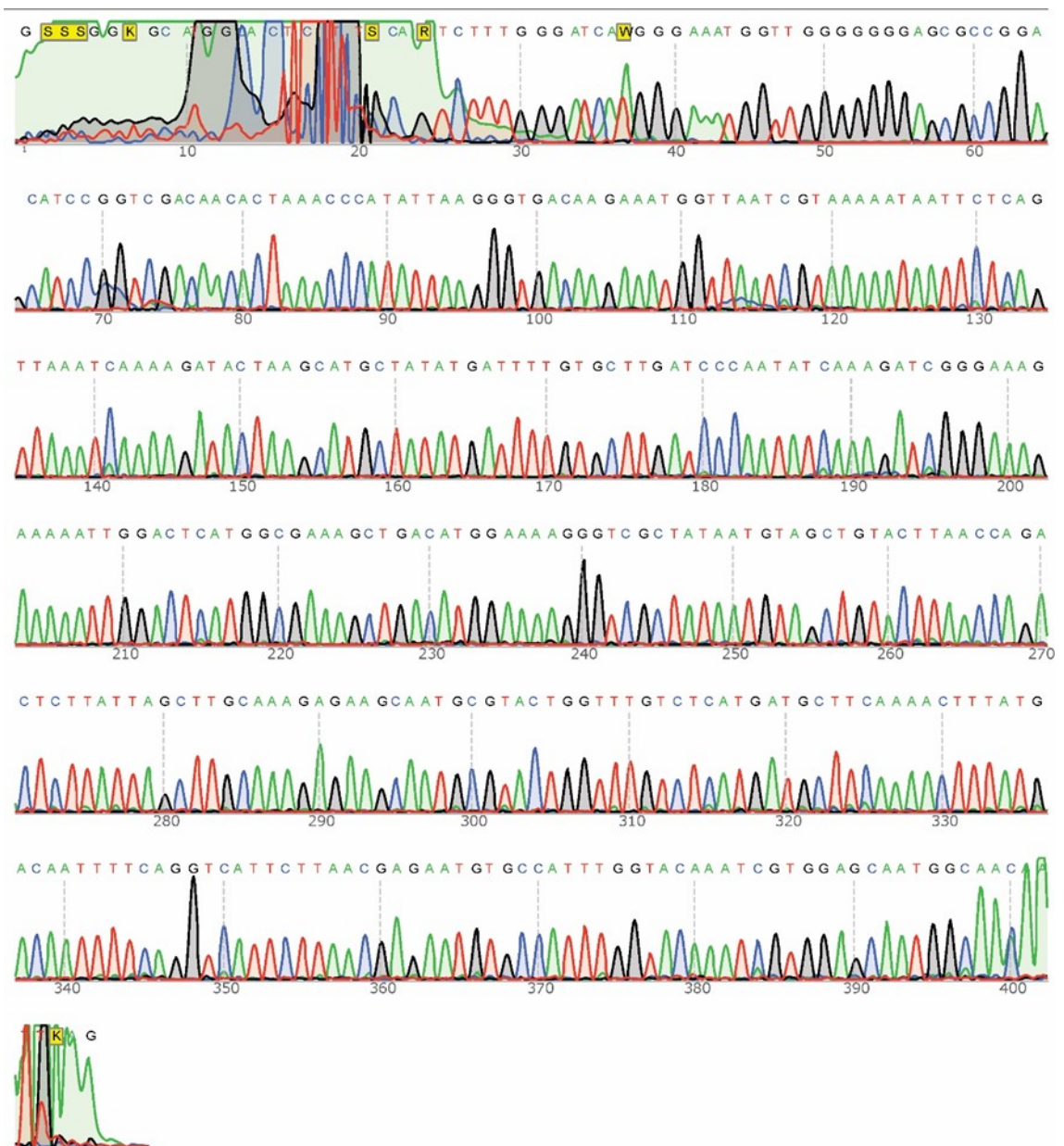
#### 4. CONCLUSÕES

A cepa probiótica *L. rhamnosus* HN001 revelou potencial para a produção de Garvieacina Q através das análises *in silico*, baseadas em similaridades gênicas com agrupamentos genéticos responsáveis pela síntese, imunidade e secreção da bacteriocina GarQ de seu produtor natural. Além disso, as análises moleculares puderam confirmar a presença e as sequências dos genes codificadores da GarQ no genoma desta cepa. Foi possível projetar um par de iniciadores específicos para a detecção de *garQ* no genoma da cepa analisada, e obter resultados satisfatórios de amplificação da região alvo do gene que diferenciava demais cepas

de *L. rhamnosus*, não produtoras de GarQ da cepa produtora HN001, confirmando a especificidade dos iniciadores sintetizados. No entanto, não foi possível observar a produção de peptídeos antimicrobianos nas análises *in vitro* com as condições aqui testadas. Acredita-se que *L. rhamnosus* HN001 necessite de condições otimizadas, principalmente relacionadas à temperatura de cultivo, pH e composição do meio, para produzir GarQ, além de futuras análises de expressão gênica específicas.

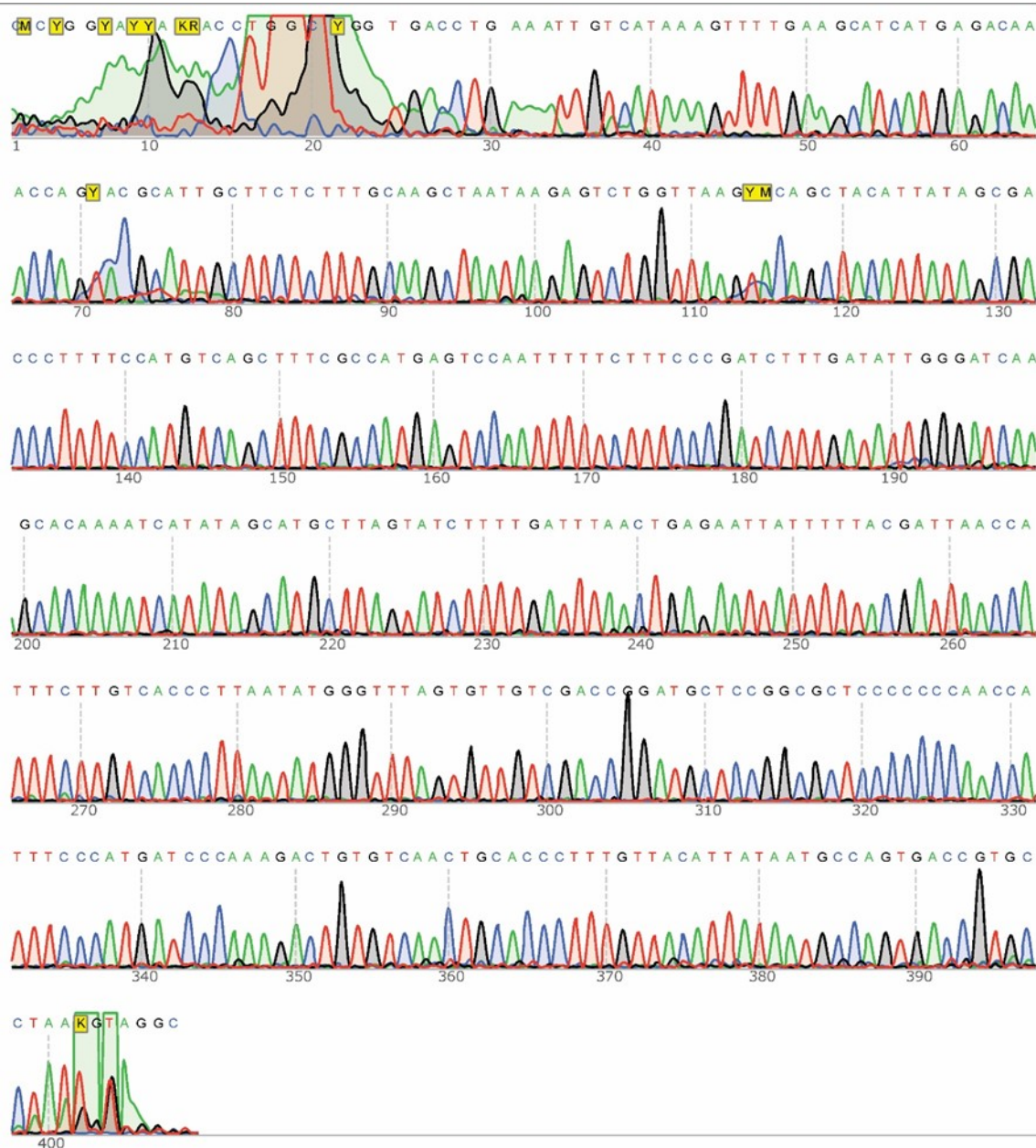
## INFORMAÇÃO DE APOIO SUPLEMENTAR

Figura S1 - Eletroferograma do sequenciamento de Sanger com o iniciador garQFor com 407 pb.



Picos bem delineados denotam bases nucleotídicas com alta qualidade, enquanto que regiões onde não há picos, ou existem picos muito altos, ou ainda há forte aumento da fluorescência de fundo, denotam bases nucleotídicas com baixo score de qualidade. Adenina – A é representada na cor verde, Timina – T é representada na cor vermelha, Citosina – C é representada na cor azul e Guanina - G é representada na cor preta.

Figura S2- Eletroferograma do sequenciamento de Sanger com o primer garQRev com 408 pb.



Picos bem delineados denotam bases nucleotídicas com alta qualidade, enquanto que regiões onde não há picos, ou existem picos muito altos, ou ainda há forte aumento da fluorescência de fundo, denotam bases nucleotídicas com baixo score de qualidade. Adenina – A é representada na cor verde, Timina – T é representada na cor vermelha, Citosina – C é representada na cor azul e Guanina - G é representada na cor preta.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

*Lactocaseibacillus rhamnosus* é uma bactéria amplamente caracterizada como probiótica, devido aos extensos relatos de efeitos benéficos para a saúde humana derivados da sua utilização. Entretanto, cada vez mais, evidências apontam que os efeitos benéficos de probióticos bacterianos são específicos da cepa. Em função disso, estudos referentes à estrutura de população buscando a distribuição de genes relacionados aos efeitos probióticos, além de pesquisas que explorem as moléculas efetoras probióticas expressas por esses microrganismos são promissores.

As análises *in silico* da primeira etapa desta pesquisa, analisando a estrutura de população de *L. rhamnosus*, foram determinantes na otimização do mapeamento de genes relacionados a efeitos probióticos da espécie. Os resultados obtidos indicam que há um grupo reduzido de isolados de *L. rhamnosus* que possuem um cluster gênico capaz de produzir um tipo pouco comum de bacteriocina.

Também realizamos o primeiro estudo de comparações gênicas necessárias ao desenho de iniciadores específicos para a detecção dos genes codificadores da bacteriocina Garvieacina Q por cepas pertencentes a espécie *L. rhamnosus*, com destaque para a cepa HN001. Nos resultados conseguimos observar a especificidade dos iniciadores sintetizados. Esses resultados, associados ao mapeamento da distribuição dos genes *garCD*, constituem o segundo artigo desta tese.

Na complementação desses resultados, espera-se estimular estudos futuros de otimização das condições da biossíntese de bacteriocina pela cepa *L. rhamnosus* HN001, bem como da expressão gênica dos genes codificadores de GarQ nesta cepa. Podendo contribuir para possíveis pesquisas que busquem, não apenas detectar de forma rápida e específica GarQ em *L. rhamnosus*, mas também a produção biotecnológica em maiores escalas desta promissora bacteriocina.

## REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHI, Soosan *et al.* Listeria monocytogenes and Salmonella enterica affect the expression of nisin gene and its production by Lactococcus lactis. **Microbial pathogenesis**, v. 123, p. 28-35, 2018.
- ABRIOUEL, H. *et al.* New insights in antibiotic resistance of Lactobacillus species from fermented foods. **Food Research International**, v. 78, p. 465-481, 2015.
- ACEDO, Jeella Z. *et al.* The expanding structural variety among bacteriocins from Gram-positive bacteria. **FEMS microbiology reviews**, v. 42, n. 6, p. 805-828, 2018.
- AGRIOPOULOU, S. *et al.* Lactic acid bacteria as antibacterial agents to extend the shelf life of fresh and minimally processed fruits and vegetables: Quality and safety aspects. **Microorganisms**, v. 8, n. 6, p. 952, 2020.
- ALEKSANDRZAK-PIEKARCZYK, T.; KORYSZEWSKA-BAGIŃSKA, A.; BARDOWSKI, J. Genome sequence of the probiotic strain Lactobacillus rhamnosus (formerly Lactobacillus casei) LOCK900. **Genome Announcements**, v. 1, n. 4, p. e00640-13, 2013.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ALVAREZ-SIEIRO, P. *et al.* Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 7, p. 2939-2951, 2016.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Instrução Processual de Petição de Avaliação de Probióticos para Uso em Alimentos. Guia nº 21/2021 – versão 2**, de 16 de Maio de 2021. Disponível em:<<http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5280930/guia+21+v2.pdf/dac5bf5f-ae56-4444-b53c-2cf0f7c15301>> Acessado em: 26 de Maio de 2021.
- ANTOSHINA, Daria V.; BALANDIN, Sergey V.; OVCHINNIKOVA, Tatiana V. Structural Features, Mechanisms of Action, and Prospects for Practical Application of Class II Bacteriocins. **Biochemistry (Moscow)**, v. 87, n. 11, p. 1387-1403, 2022.
- ARNDT, D. *et al.* PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. **Nucleic acids research**, v. 44, n. W1, p. W16-W21, 2016.
- ASPRI, M.; PAPADEMÁS, P.; TSALTAS, D. Review on non-dairy probiotics and their use in non-dairy based products. **Fermentation**, v. 6, n. 1, p. 30, 2020.
- AYTAC, Zeynep *et al.* Development of biodegradable and antimicrobial electrospun zein fibers for food packaging. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 8, n. 40, p. 15354-15365, 2020.

AZAD, M. *et al.* Probiotic species in the modulation of gut microbiota: an overview. **BioMed research international**, v. 2018, 2018.

BAN, Changill; YANG, Wei. Crystal structure and ATPase activity of MutL: implications for DNA repair and mutagenesis. **Cell**, v. 95, n. 4, p. 541-552, 1998.

BAO, Qihua *et al.* Multilocus sequence typing of *Lactobacillus casei* isolates from naturally fermented foods in China and Mongolia. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 7, p. 5202-5213, 2016.

BARBOUR, Abdelahhad; WESCOMBE, Philip; SMITH, Leif. Evolution of lantibiotic salivaricins: new weapons to fight infectious diseases. **Trends in microbiology**, v. 28, n. 7, p. 578-593, 2020.

BARMAN, Soma; GHOSH, Ranjan; MANDAL, Narayan C. Production optimization of broad spectrum bacteriocin of three strains of *Lactococcus lactis* isolated from homemade buttermilk. **Annals of Agrarian Science**, v. 16, n. 3, p. 286-296, 2018.

BHAT, M. I. *et al.* Adherence capability and safety assessment of an indigenous probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* MTCC-5897. **Microbial pathogenesis**, v. 130, p. 120-130, 2019.

BHAT, M. I. *et al.* Potential probiotic *Lactobacillus rhamnosus* (MTCC-5897) inhibits *Escherichia coli* impaired intestinal barrier function by modulating the host tight junction gene response. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 12, n. 3, p. 1149-1160, 2020.

BEIJERINCK, M. W. Anhaufungsversuche mit ureumbakterien. **Zentralbl. Bakterol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. II.**, v. 7, p. 33-61, 1901.

BENDJEDDOU, K. *et al.* Characterization and purification of a bacteriocin from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BMK2005, an intestinal isolate active against multidrug-resistant pathogens. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 28, p. 1543–1552, 2012.

BOUSMAHA-MARROKI, L. *et al.* In Vitro Anti-staphylococcal and Anti-inflammatory Abilities of *Lactobacillus rhamnosus* from Infant Gut Microbiota as Potential Probiotic Against Infectious Women Mastitis. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, p. 1-12, 2021.

BOTTARI, Benedetta *et al.* Effective identification of *Lactobacillus casei* group species: genome-based selection of the gene *mutL* as the target of a novel multiplex PCR assay. **Microbiology**, v. 163, n. 7, p. 950-960, 2017.

BRYNILDSRUD, O. *et al.* Rapid scoring of genes in microbial pan-genome-wide association studies with Scoary. **Genome biology**, v. 17, n. 1, p. 1-9, 2016.

BYL, E. *et al.* Strain-specific differences in behaviour among *Lactobacillus rhamnosus* cell wall mutants during direct compression. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 588, p. 119755, 2020.



CAPURSO, L. Thirty years of *Lactobacillus rhamnosus* GG: a review. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 53, p. S1-S41, 2019.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. **Critical reviews in microbiology**, v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002.

CEAPA, C. *et al.* Correlation of *Lactobacillus rhamnosus* genotypes and carbohydrate utilization signatures determined by phenotype profiling. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 16, p. 5458-5470, 2015.

CEAPA, C. *et al.* The variable regions of *Lactobacillus rhamnosus* genomes reveal the dynamic evolution of metabolic and host-adaptation repertoires. **Genome biology and evolution**, v. 8, n. 6, p. 1889-1905, 2016.

CHEN, Shi-Yu *et al.* A novel bacteriocin against multiple foodborne pathogens from *Lactocaseibacillus rhamnosus* isolated from juice ferments: ATF perfusion-based preparation of viable cells, characterization, antibacterial and antibiofilm activity. **Current Research in Food Science**, v. 6, p. 100484, 2023.

CHEN, Y. *et al.* Orally administered CLA ameliorates DSS-induced colitis in mice via intestinal barrier improvement, oxidative stress reduction, and inflammatory cytokine and gut microbiota modulation. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 67, n. 48, p. 13282-13298, 2019.

CHENOLL, E. *et al.* Complete genome sequence of *Lactobacillus rhamnosus* strain BPL5 (CECT 8800), a probiotic for treatment of bacterial vaginosis. **Genome announcements**, v. 4, n. 2, 2016.

CHERVINETS, Y. *et al.* Adaptation and probiotic potential of lactobacilli, isolated from the oral cavity and intestines of healthy people. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 10, n. 1, p. 22-33, 2018.

COLLINS, Fergus WJ *et al.* Bacteriocin Gene-Trait matching across the complete *Lactobacillus* Pan-genome. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 3481, 2017.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 777-788, 2005.

CUI, Yanhua; QU, Xiaojun. Genetic mechanisms of prebiotic carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria: Emphasis on *Lactocaseibacillus casei* and *Lactocaseibacillus paracasei* as flexible, diverse and outstanding prebiotic carbohydrate starters. **Trends in Food Science & Technology**, v. 115, p. 486-499, 2021.

CUI, Yanlong *et al.* Mining, heterologous expression, purification, antibactericidal mechanism, and application of bacteriocins: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 1, p. 863-899, 2021.

DALIRI, E. B. M. *et al.* Probiotic Effector Compounds: Current Knowledge and Future Perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021.

DA SILVA FERRARI, I. *et al.* Selection of autochthonous lactic acid bacteria from goat dairies and their addition to evaluate the inhibition of *Salmonella typhi* in artisanal cheese. **Food microbiology**, v. 60, p. 29-38, 2016.

DE BOECK, I. *et al.* Lactobacilli have a niche in the human nose. **Cell Reports**, v. 31, n. 8, p. 107674, 2020.

DELGADO, S. *et al.* Molecules produced by probiotics and intestinal microorganisms with immunomodulatory activity. **Nutrients**, v. 12, n. 2, p. 391, 2020.

DE MARCO, Ivan *et al.* Bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) synthesized by *Lactococcus lactis* LLH20: Antilisterial activity and application for biopreservation of minimally processed lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 42, p. 102355, 2022.

DESIDERATO, Christian K. *et al.* Garvicin Q: characterization of biosynthesis and mode of action. **Microbial Cell Factories**, v. 21, n. 1, p. 1-18, 2022.

DIEP, Dzung B. *et al.* The synthesis of the bacteriocin sakacin A is a temperature-sensitive process regulated by a pheromone peptide through a three-component regulatory system. **Microbiology**, v. 146, n. 9, p. 2155-2160, 2000.

DIMITRIJEVIĆ, Rajna *et al.* The identification of a low molecular mass bacteriocin, rhamnosin A, produced by *Lactobacillus rhamnosus* strain 68. **Journal of applied microbiology**, v. 107, n. 6, p. 2108-2115, 2009.

DOS SANTOS MORAIS, R. *et al.* A fast, efficient and easy to implement method to purify bacterial pili from *Lactobacillus rhamnosus* GG based on multimodal chromatography. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 3225, 2020.

DOUILLARD, F. P. *et al.* Polymorphisms, chromosomal rearrangements, and mutator phenotype development during experimental evolution of *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Applied and environmental microbiology**, v. 82, n. 13, p. 3783-3792, 2016.

DOUILLARD, F. P. *et al.* Functional identification of conserved residues involved in *Lactobacillus rhamnosus* strain GG sortase specificity and pilus biogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 22, p. 15764-15775, 2014.

DOUILLARD, F. P. *et al.* Comparative genomic and functional analysis of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains marketed as probiotics. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 6, p. 1923-1933, 2013.

DUAR, R. M. *et al.* Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. **FEMS microbiology reviews**, v. 41, n. Supp\_1, p. S27-S48, 2017.

DUGUID, J. P.; GILLIES, R. R. Non-flagellar filamentous appendages (Fimbriae) and haemagglutinating activity in dysentery bacilli. In: **Journal of General Microbiology**. MARLBOROUGH HOUSE, BASINGSTOKE RD, SPENCERS WOODS, READING RG7 1AE, BERKS, ENGLAND: SOC GENERAL MICROBIOLOGY, 1956. p. R6-R6.

DURASAMY, Senbagam *et al.* Bacteriocin—a potential antimicrobial peptide towards disrupting and preventing biofilm formation in the clinical and environmental locales. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 44922-44936, 2020.

DUTRA-SILVA, Lorena; MATTEOLI, Filipe P.; ARISI, Ana Carolina Maisonnave. Distribution of Genes Related to Probiotic Effects Across *Lactocaseibacillus rhamnosus* Revealed by Population Structure. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, p. 1-10, 2021.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.

FAO/WHO. **Discussion paper on harmonized probiotic guidelines for use in food and dietary supplements**. Disponível em: <[http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FMeetings%252FCX-720-40%252FWD%252Fnf40\\_12e.pdf](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FMeetings%252FCX-720-40%252FWD%252Fnf40_12e.pdf)>. Acessado em: 26 de maio de 2021.

FENG, Yiming *et al.* Co-assembly of nisin and zein in microfluidics for enhanced antilisterial activity in Queso Fresco. **LWT**, v. 111, p. 355-362, 2019.

FLÓREZ, Ana Belén *et al.* Genome sequence of *Lactococcus garvieae* IPLA 31405, a bacteriocin-producing, tetracycline-resistant strain isolated from a raw-milk cheese. 2012.

FREDUA-AGYEMAN, M. *et al.* Microcalorimetric evaluation of a multi-strain probiotic: Interspecies inhibition between probiotic strains. **Journal of Functional Foods**, v. 36, p. 357-361, 2017.

FURTADO, Danieli N. *et al.* Goat milk and cheeses may be a good source for antilisterial bacteriocin-producing lactic acid bacteria. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 23, n. sup1, p. 775-778, 2009.

GAO, J. *et al.* A novel postbiotic from *Lactobacillus rhamnosus* GG with a beneficial effect on intestinal barrier function. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 477, 2019.

GASCUEL, O. BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. **Molecular biology and evolution**, v. 14, n. 7, p. 685-695, 1997.

GOLICZ, Agnieszka A. *et al.* Pangenomics comes of age: from bacteria to plant and animal applications. **Trends in Genetics**, v. 36, n. 2, p. 132-145, 2020.

GONTIJO, Marco Túlio Pardini *et al.* Phylogenetic distribution of the bacteriocin repertoire of lactic acid bacteria species associated with artisanal cheese. **Food Research International**, v. 128, p. 108783, 2020.

GRANT, J. R.; ARANTES, A. S.; STOTHARD, P. Comparing thousands of circular genomes using the CGView Comparison Tool. **BMC genomics**, v. 13, n. 1, p. 1-8, 2012.

GUANDALINI, S. Probiotics for prevention and treatment of diarrhea. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 45, p. S149-S153, 2011.

GUARINO, A.; GUANDALINI, S.; VECCHIO, A. L. Probiotics for prevention and treatment of diarrhea. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 49, p. S37-S45, 2015.

GUERIN, J. *et al.* Adhesion of *Lactobacillus rhamnosus* GG surface biomolecules to milk proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 82, p. 296-303, 2018.

GUMIENNA, Małgorzata; GÓRNA, Barbara. Antimicrobial food packaging with biodegradable polymers and bacteriocins. **Molecules**, v. 26, n. 12, p. 3735, 2021.

HALAMI, Prakash M. Sublichenin, a new subtilin-like lantibiotics of probiotic bacterium *Bacillus licheniformis* MCC 2512T with antibacterial activity. **Microbial pathogenesis**, v. 128, p. 139-146, 2019.

HEGARTY, J. W. *et al.* Bacteriocin production: a relatively unharnessed probiotic trait?. **F1000Research**, v. 5, 2016.

HENDRICKX, A. P. *et al.* Architects at the bacterial surface—sortases and the assembly of pili with isopeptide bonds. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 166-176, 2011.

HERBIN, Sabine *et al.* Characteristics and genetic determinants of bacteriocin activities produced by *Carnobacterium piscicola* CP5 isolated from cheese. **Current microbiology**, v. 35, p. 319-326, 1997.

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

HILL, D. *et al.* The *Lactobacillus casei* group: history and health related applications. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 2107, 2018.

HU, Chih-Bo *et al.* Enterocin X, a novel two-peptide bacteriocin from *Enterococcus faecium* KU-B5, has an antibacterial spectrum entirely different from those of its component peptides. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 13, p. 4542-4545, 2010.

HUANG, Chien-Hsun *et al.* Identification and classification for the *Lactobacillus casei* group. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1974, 2018.

HYNDMAN, David L.; MITSUHASHI, Masato. PCR primer design. **PCR protocols**, p. 81-88, 2003.

- IBARRA-MARTÍNEZ, David *et al.* Atividade antibacteriana de sobrenadantes de *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Pediococcus pentosaceus* e curcumina contra *Aeromonas hydrophila*. Estudo *in vitro*. **Comunicações de Pesquisa Veterinária**, p. 1-12, 2022.
- IBARRA-SÁNCHEZ, Luis A.; VAN TASSELL, Maxwell L.; MILLER, Michael J. Antimicrobial behavior of phage endolysin PlyP100 and its synergy with nisin to control *Listeria monocytogenes* in Queso Fresco. **Food microbiology**, v. 72, p. 128-134, 2018.
- IBARRA-SÁNCHEZ, Luis A. *et al.* Invited review: Advances in nisin use for preservation of dairy products. **Journal of dairy science**, v. 103, n. 3, p. 2041-2052, 2020.
- JACQUET, Thibaut *et al.* Antibacterial activity of class IIa bacteriocin Cbn BM1 depends on the physiological state of the target bacteria. **Research in microbiology**, v. 163, n. 5, p. 323-331, 2012.
- JOHNSON, Brant R.; KLAENHAMMER, Todd R. Impact of genomics on the field of probiotic research: historical perspectives to modern paradigms. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 106, n. 1, p. 141-156, 2014.
- JOHNSON, Eldin Maliyakkal *et al.* Bacteriocins as food preservatives: Challenges and emerging horizons. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 58, n. 16, p. 2743-2767, 2018.
- KALLIOMÄKI, M. *et al.* Probióticos na prevenção primária da doença atópica: um ensaio randomizado controlado com placebo. **The Lancet**, v. 357, n. 9262, pág. 1076-1079, 2001.
- KANT, R. *et al.* A comparative pan-genome perspective of niche-adaptable cell-surface protein phenotypes in *Lactobacillus rhamnosus*. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e102762, 2014.
- KAMAL, Rania M. *et al.* Bio-controlling capability of probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* against some common foodborne pathogens in yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 85, p. 1-7, 2018.
- KARLSSON, M. *et al.* *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 enhances NF-kappaB activation in *Escherichia coli*-stimulated urinary bladder cells through TLR4. **BMC microbiology**, v. 12, n. 1, p. 1-10, 2012.
- KHORSHIDIAN, Nasim *et al.* Antibacterial activity of pediocin and pediocin-producing bacteria against *Listeria monocytogenes* in meat products. **Frontiers in microbiology**, v. 12, p. 709959, 2021.
- KIM, Kyung Hyun *et al.* Genomic and metabolic features of *Lactobacillus sakei* as revealed by its pan-genome and the metatranscriptome of kimchi fermentation. **Food microbiology**, v. 86, p. 103341, 2020.
- KIRTONIA, K. *et al.* Bacteriocin: A new strategic antibiofilm agent in food industries. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 36, p. 102141, 2021.

KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS microbiology reviews**, v. 12, n. 1-3, p. 39-85, 1993.

KLAENHAMMER, T. R.; DE VOS, W. M. An incredible scientific journey. The evolutionary tale of the lactic acid bacteria. In: **The 10th LAB symposium. Thirty years of research on lactic acid bacteria**. 24 Media Labs, 2011. p. 1-11.

KLINE, K. A. *et al.* A tale of two pili: assembly and function of pili in bacteria. **Trends in microbiology**, v. 18, n. 5, p. 224-232, 2010.

KUMARI, R. *et al.* Probiotics, prebiotics, and synbiotics: Current status and future uses for human health. In: **du**, 2020. p. 173-190.

KUO, Yang-Cheng *et al.* Characterization of putative class II bacteriocins identified from a non-bacteriocin-producing strain *Lactobacillus casei* ATCC 334. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, p. 237-246, 2013.

KWOJI, I. D. *et al.* Multi-Strain Probiotics: Synergy among Isolates Enhances Biological Activities. **Biology**, v. 10, n. 4, p. 322, 2021.

LAGEDROSTE, Marcel *et al.* A structural view on the maturation of lanthipeptides. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1183, 2020.

LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. C. J. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 171-184, 2010.

LEBEER, S. *et al.* Functional analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG pili in relation to adhesion and immunomodulatory interactions with intestinal epithelial cells. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 1, p. 185-193, 2012.

LEBEER, S. *et al.* Identification of probiotic effector molecules: present state and future perspectives. **Current opinion in biotechnology**, v. 49, p. 217-223, 2018.

LEE, Jun-Yeong *et al.* Comparative genomics of *Lactobacillus salivarius* strains focusing on their host adaptation. **Microbiological research**, v. 205, p. 48-58, 2017.

LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. **Nucleic acids research**, v. 47, n. W1, p. W256-W259, 2019.

LEWUS, Catherine B.; MONTVILLE, Thomas J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 13, n. 2, p. 145-150, 1991.

LIPTÁKOVÁ, D.; VALÍK, L.; MEDVEŽOVÁ, A. Characterization of the growth of *Lactobacillus rhamnosus* GG in milk at suboptimal temperatures. **J Food Nutr Res**, v. 47, p. 60-67, 2008.

LIU, W. *et al.* Biodiversity of lactic acid bacteria. In: **Lactic acid bacteria**. Springer, Dordrecht, 2014. p. 103-203.

- LIU, Z. *et al.* Study of the alleviation effects of a combination of *Lactobacillus rhamnosus* and inulin on mice with colitis. **Food & function**, v. 11, n. 5, p. 3823-3837, 2020.
- LOPES, Nathalie Almeida; PINILLA, Cristian Mauricio Barreto; BRANDELLI, Adriano. Antimicrobial activity of lysozyme-nisin co-encapsulated in liposomes coated with polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 93, p. 1-9, 2019.
- MA, Feiyang *et al.* Use of antimicrobials in food animals and impact of transmission of antimicrobial resistance on humans. **Biosafety and Health**, v. 3, n. 1, p. 32-38, 2021.
- MAIDEN, M. C. J. *et al.* MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 728-736, 2013.
- MAŁACZEWSKA, Joanna; KACZOREK-ŁUKOWSKA, Edyta. Nisin—A lantibiotic with immunomodulatory properties: A review. **Peptides**, v. 137, p. 170479, 2021.
- MARTÍN, R. *et al.* The potential probiotic *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690 strain protects the intestinal barrier by stimulating both mucus production and cytoprotective response. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2019.
- MCCAUGHEY, Laura C. *et al.* Efficacy of species-specific protein antibiotics in a murine model of acute *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 30201, 2016.
- MEGTA, A. K. *et al.* Crystal structure of basal pilin SpaE reveals the molecular basis of its incorporation in the lactobacillar SpaFED pilus. **Journal of structural biology**, v. 207, n. 1, p. 74-84, 2019.
- MENG, Fanqiang *et al.* A class III bacteriocin with broad-spectrum antibacterial activity from *Lactobacillus acidophilus* NX2-6 and its preservation in milk and cheese. **Food Control**, v. 121, p. 107597, 2021.
- MERCADO, Victor; OLMOS, Jorge. Bacteriocin production by *Bacillus* species: Isolation, characterization, and application. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 14, n. 6, p. 1151-1169, 2022.
- MIN, M. *et al.* Non-dairy probiotic food products: An emerging group of functional foods. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 59, n. 16, p. 2626-2641, 2019.
- MINH, B. Q. *et al.* IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. **Molecular biology and evolution**, v. 37, n. 5, p. 1530-1534, 2020.
- MOKOENA, M. P. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. **Molecules**, v. 22, n. 8, p. 1255, 2017.
- MONTEAGUDO-MERA, A. *et al.* Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, n. 16, p. 6463-6472, 2019.

MORITA, H. *et al.* Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103. **Journal of bacteriology**, v. 191, n. 24, p. 7630-7631, 2009.

MÖRKEL, S. *et al.* Probiotics and the microbiota-gut-brain axis: focus on psychiatry. **Current nutrition reports**, v. 9, n. 3, p. 171-182, 2020.

MOROVIC, W.; BUDINOFF, C. R. Epigenetics: A new frontier in probiotic research. **Trends in microbiology**, v. 29, n. 2, p. 117-126, 2021.

MORTVEDT-ABILDGAA, C. I. *et al.* Production and pH-dependent bactericidal activity of lactocin S, a lantibiotic from *Lactobacillus sake* L45. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 175-179, 1995.

MOTTA, Amanda S.; BRANDELLI, Adriano. Evaluation of environmental conditions for production of bacteriocin-like substance by *Bacillus* sp. strain P34. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 641-646, 2008.

MOURA, A. *et al.* Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes*. **Nature microbiology**, v. 2, n. 2, p. 1-10, 2016.

NAYAK, Ashwath *et al.* Potential application of bacteriocins for sustainable aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 14, n. 3, p. 1234-1248, 2022.

NELIOS, Grigorios *et al.* New Wild-Type *Lactocaseibacillus rhamnosus* Strains as Candidates to Manage Type 1 Diabetes. **Microorganisms**, v. 10, n. 2, p. 272, 2022.

NES, Ingolf F.; JOHNSBORG, Ola. Exploration of antimicrobial potential in LAB by genomics. **Current opinion in biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 100-104, 2004.

NISSILÄ, E. *et al.* Genotypic and phenotypic diversity of *Lactobacillus rhamnosus* clinical isolates, their comparison with strain GG and their recognition by complement system. **PLoS One**, v. 12, n. 5, p. e0176739, 2017.

NIVOLIEZ, A. *et al.* Influence of manufacturing processes on in vitro properties of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35®. **Journal of biotechnology**, v. 160, n. 3-4, p. 236-241, 2012.

OAK, S. J.; JHA, Rajesh. The effects of probiotics in lactose intolerance: A systematic review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 59, n. 11, p. 1675-1683, 2019.

OH, N. S. *et al.* Probiotic and anti-inflammatory potential of *Lactobacillus rhamnosus* 4B15 and *Lactobacillus gasseri* 4M13 isolated from infant feces. **PloS one**, v. 13, n. 2, p. e0192021, 2018.

OKKERS, D. J. *et al.* Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, n. 5, p. 726-734, 1999.



OLIVEIRA, L. D. C. *et al.* In silico prediction, in vitro antibacterial spectrum, and physicochemical properties of a putative bacteriocin produced by *Lactobacillus rhamnosus* strain L156. 4. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 876, 2017.

O'LEARY, N. A. *et al.* Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. **Nucleic acids research**, v. 44, n. D1, p. D733-D745, 2016.

ONDOV, B. D. *et al.* Mash: fast genome and metagenome distance estimation using MinHash. **Genome biology**, v. 17, n. 1, p. 1-14, 2016.

ONG, I. M. *et al.* Gut microbiome populations are associated with structure-specific changes in white matter architecture. **Translational psychiatry**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2018.

ORLA-JENSEN, S. **The lactic acid bacteria**. Copenhagen: Andr Fred Høst and Son, 1919.

PAGE, A. J. *et al.* Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. **Bioinformatics**, v. 31, n. 22, p. 3691-3693, 2015.

PAGE, A. J. *et al.* SNP-sites: rapid efficient extraction of SNPs from multi-FASTA alignments. **Microbial genomics**, v. 2, n. 4, 2016.

PANGHAL, A. *et al.* Potential non-dairy probiotic products—A healthy approach. **Food bioscience**, v. 21, p. 80-89, 2018.

PAPIZADEH, M. *et al.* *Lactobacillus rhamnosus* Gorbach-Goldin (GG): a top well-researched probiotic strain. **Journal of Medical Bacteriology**, v. 5, n. 5-6, p. 46-59, 2016.

PARADIS, E.; CLAUDE, J.; STRIMMER, K. APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. **Bioinformatics**, v. 20, n. 2, p. 289-290, 2004.

PASCUAL, L. M. *et al.* *Lactobacillus rhamnosus* L60, a potential probiotic isolated from the human vagina. **The Journal of general and applied microbiology**, v. 54, n. 3, p. 141-148, 2008.

PETROVA, M. I. *et al.* Comparative genomic and phenotypic analysis of the vaginal probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1278, 2018.

PETROVA, M. I.; REID, G.; TER HAAR, J. A. Lacticaseibacillus rhamnosus GR-1, aka *Lactobacillus rhamnosus* GR-1: Past and Future Perspectives. **Trends in Microbiology**, 2021.

PINO, A. *et al.* A clinical pilot study on the effect of the probiotic *Lacticaseibacillus rhamnosus* TOM 22.8 strain in women with vaginal dysbiosis. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2021.

PLAZA-DIAZ, J. *et al.* Mechanisms of action of probiotics. **Advances in Nutrition**, v. 10, n. suppl\_1, p. S49-S66, 2019.

RAMOS, Bárbara *et al.* Biopreservation approaches to reduce *Listeria monocytogenes* in fresh vegetables. **Food microbiology**, v. 85, p. 103282, 2020.

RASINKANGAS, P. *et al.* Characterization of Highly Mucus-Adherent Non-GMO Derivatives of *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 8, p. 1024, 2020.

REUNANEN, J. *et al.* Characterization of the SpaCBA pilus fibers in the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 7, p. 2337-2344, 2012.

RICHARD, B. *et al.* Identification of salivary *Lactobacillus rhamnosus* species by DNA profiling and a specific probe. **Research in microbiology**, v. 152, n. 2, p. 157-165, 2001.

RINTAHAKA, J. *et al.* Phenotypical analysis of the *Lactobacillus rhamnosus* GG fimbrial spaFED operon: surface expression and functional characterization of recombinant SpaFED pili in *Lactococcus lactis*. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e113922, 2014.

ROOBAB, U. *et al.* Sources, formulations, advanced delivery and health benefits of probiotics. **Current Opinion in Food Science**, v. 32, p. 17-28, 2020.

ROSSI, F.; AMADORO, C.; COLAVITA, G. Members of the *Lactobacillus* genus complex (LGC) as opportunistic pathogens: a review. **Microorganisms**, v. 7, n. 5, p. 126, 2019.

SALVETTI, E.; O'TOOLE, P. W. When regulation challenges innovation: The case of the genus *Lactobacillus*. **Trends in Food Science & Technology**, v. 66, p. 187-194, 2017.

SALVETTI, E. *et al.* Comparative genomics of the genus *Lactobacillus* reveals robust phylogroups that provide the basis for reclassification. **Applied and environmental microbiology**, v. 84, n. 17, 2018.

SÁNCHEZ-OSUNA, Miquel; BARBÉ, Jordi; ERILL, Ivan. Systematic in silico assessment of antimicrobial resistance dissemination across the global plasmidome. **Antibiotics**, v. 12, n. 2, p. 281, 2023.

SARIKA, A. R.; LIPTON, Aaron P.; AISHWARYA, M. S. Biopreservative efficacy of bacteriocin GP1 of *Lactobacillus rhamnosus* GP1 on stored fish filets. **Frontiers in nutrition**, v. 6, p. 29, 2019.

SCHNEIDER, T. D.; STEPHENS, R. M. Sequence logos: a new way to display consensus sequences. **Nucleic acids research**, v. 18, n. 20, p. 6097-6100, 1990.

SEPPEY, M.; MANNI, M.; ZDOBNOV, E. M. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness. In: **Gene prediction**. Humana, New York, NY, 2019. p. 227-245.

SEGBERS, M. E.; LEBEER, S. Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG-host interactions. **Microbial cell factories**, v. 13, n. 1, p. 1-16, 2014.

SHARMA, Basista Rabina; HALAMI, Prakash M.; TAMANG, Jyoti Prakash. Novel pathways in bacteriocin synthesis by lactic acid bacteria with special reference to ethnic fermented foods. **Food Science and Biotechnology**, p. 1-16, 2021.

SHEPPARD, S. K.; GUTTMAN, D. S.; FITZGERALD, J. R. Population genomics of bacterial host adaptation. **Nature Reviews Genetics**, v. 19, n. 9, p. 549-565, 2018.

SILVA, M. *et al.* chewBBACA: a complete suite for gene-by-gene schema creation and strain identification. **Microbial genomics**, v. 4, n. 3, 2018.

SINGH, A. *et al.* Metabiotics: the functional metabolic signatures of probiotics: current state-of-art and future research priorities—metabiotics: probiotics effector molecules. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 9, n. 04, p. 147, 2018.

SOLTANI, Samira *et al.* Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: toxicity aspects and regulations. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 45, n. 1, p. fuaa039, 2021.

SONG, Yuqin *et al.* Genetic diversity and population structure of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* isolated from naturally fermented dairy foods. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 22704, 2016.

SOROOSH, A. *et al.* miR-24 is elevated in ulcerative colitis patients and regulates intestinal epithelial barrier function. **The American journal of pathology**, v. 189, n. 9, p. 1763-1774, 2019.

SPACOVA, I.; O'NEILL, C.; LEBEER, S. *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG inhibits infection of human keratinocytes by *Staphylococcus aureus* through mechanisms involving cell surface molecules and pH reduction. **Beneficial Microbes**, v. 11, n. 7, p. 703-715, 2020.

SRINIVASAN, R. *et al.* Purification and characterization of a bacteriocin from *Lactobacillus rhamnosus* L34. **Annals of microbiology**, v. 63, n. 1, p. 387-392, 2013.

SUN, Zhihong *et al.* Population structure of *Lactobacillus helveticus* isolates from naturally fermented dairy products based on multilocus sequence typing. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 5, p. 2962-2972, 2015.

SUN, Zhilan *et al.* Class III bacteriocin Helveticin-M causes sublethal damage on target cells through impairment of cell wall and membrane. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 45, n. 3, p. 213-227, 2018.

SURACHAT, Komwit *et al.* In silico analysis of protein toxin and bacteriocins from *Lactobacillus paracasei* SD1 genome and available online databases. **PLoS one**, v. 12, n. 8, p. e0183548, 2017.

SZAJEWSKA, H.; KOŁODZIEJ, M. Systematic review with meta-analysis: *Lactobacillus rhamnosus* GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children and adults. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 42, n. 10, p. 1149-1157, 2015.

TKHRUNI, F. N. *et al.* Characteristic of bacteriocins of *Lactobacillus rhamnosus* BTK 20-12 potential probiotic strain. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 12, n. 2, p. 716-724, 2020.

TONKIN-HILL, G. *et al.* Fast hierarchical Bayesian analysis of population structure. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. 11, p. 5539-5549, 2019.

TOSUKHOWONG, Amonlaya *et al.* Garvieacin Q, a novel class II bacteriocin from *Lactococcus garvieae* BCC 43578. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 5, p. 1619-1623, 2012.

TRACTENBERG, R. E. *et al.* Effects of intravesical *Lactobacillus rhamnosus* GG on urinary symptom burden in people with neurogenic lower urinary tract dysfunction. **PM&R**, 2020.

TUMBARSKI, Y. *et al.* Effects of pectin-based edible coatings containing a bacteriocin of *Bacillus methylotrophicus* BM47 on the quality and storage life of fresh blackberries. **Italian Journal of Food Science**, v. 32, n. 2, 2020.

TYMOSZEWSKA, Aleksandra *et al.* The non-lantibiotic bacteriocin garvicin Q targets man-PTS in a broad spectrum of sensitive bacterial genera. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 8359, 2017.

UNTERGASSER, Andreas *et al.* Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic acids research**, v. 35, n. suppl\_2, p. W71-W74, 2007.

U.S. FDA (2001). Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000065 [Nisin, Cranbury (NJ): Rhodia, Inc.]. College Park (MD): U.S. Food and Drug Administration (U.S. FDA), Center for Food Safety & Applied Nutrition (CFSAN), Office of Premarket Approval.

Disponível em:

<<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=GRASNotices&id=65>>.

Acessado em: 20 de abril 2021.

VAN HEEL, Auke J. *et al.* BAGEL3: automated identification of genes encoding bacteriocins and (non-) bactericidal posttranslationally modified peptides. **Nucleic acids research**, v. 41, n. W1, p. W448-W453, 2013.

VAN HEEL, A. J. *et al.* BAGEL4: a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins. **Nucleic acids research**, v. 46, n. W1, p. W278-W281, 2018.

VARGAS GARCÍA, C. E. *et al.* Piliation of *Lactobacillus rhamnosus* GG promotes adhesion, phagocytosis, and cytokine modulation in macrophages. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 6, p. 2050-2062, 2015.

VEZINA, Ben; REHM, Bernd HA; SMITH, Andrew T. Bioinformatic prospecting and phylogenetic analysis reveals 94 undescribed circular bacteriocins and key motifs. **BMC microbiology**, v. 20, n. 1, p. 1-16, 2020.

VERMEULEN, Ross *et al.* Manganese privation-induced transcriptional upregulation of the class IIa bacteriocin plantaricin 423 in *Lactobacillus plantarum* strain 423. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 87, n. 21, p. e00976-21, 2021.

WACHSMAN, M. B. *et al.* Enterocin CRL35 inhibits late stages of HSV-1 and HSV-2 replication in vitro. **Antiviral research**, v. 58, n. 1, p. 17-24, 2003.

WAN, M. L. Y.; FORSYTHE, S. J.; EL-NEZAMI, H. Probiotics interaction with foodborne pathogens: a potential alternative to antibiotics and future challenges. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 59, n. 20, p. 3320-3333, 2019.

WANG, G. *et al.* Cholesterol-lowering potentials of *Lactobacillus* strain overexpression of bile salt hydrolase on high cholesterol diet-induced hypercholesterolemic mice. **Food & function**, v. 10, n. 3, p. 1684-1695, 2019.

WANG, G. *et al.* *Bifidobacterium adolescentis* and *Lactobacillus rhamnosus* alleviate non-alcoholic fatty liver disease induced by a high-fat, high-cholesterol diet through modulation of different gut microbiota-dependent pathways. **Food & function**, v. 11, n. 7, p. 6115-6127, 2020.

WANG, J. *et al.* *Lactobacillus plantarum* ZS2058 produces CLA to ameliorate DSS-induced acute colitis in mice. **RSC advances**, v. 6, n. 18, p. 14457-14464, 2016.

WEI, Yonghua *et al.* Isolation and characterization of bacteriocin-producing *Lactocaseibacillus rhamnosus* XN2 from yak yoghurt and its bacteriocin. **Molecules**, v. 27, n. 7, p. 2066, 2022.

WIĘCKOWICZ, Michał *et al.* Development of a PCR-based assay for rapid detection of class IIa bacteriocin genes. **Letters in applied microbiology**, v. 52, n. 3, p. 281-289, 2011.

WIEDEMANN, Imke *et al.* Lipid II-based antimicrobial activity of the lantibiotic plantaricin C. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 2809-2814, 2006.

WORAPRAYOTE, W. *et al.* Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. **Meat Science**, v. 120, p. 118-132, 2016.

WU, Mengjie *et al.* A review of potential antibacterial activities of nisin against *Listeria monocytogenes*: the combined use of nisin shows more advantages than single use. **Food Research International**, p. 112363, 2022.

XU, C. *et al.* Purification and antimicrobial mechanism of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus rhamnosus* 1.0320. **LWT**, v. 137, p. 110338, 2021.

YADAV, R.; SHUKLA, P. An overview of advanced technologies for selection of probiotics and their expediency: a review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 57, n. 15, p. 3233-3242, 2017.

YANAGAWA, R.; OTSUKI, K.; TOKUI, T. Electron microscopy of fine structure of *Corynebacterium renale* with special reference to pili. **Japanese journal of veterinary research**, v. 16, n. 1, p. 31-37, 1968.

ZHAO, Lei *et al.* Assessing the Safety and Probiotic Characteristics of *Lactocaseibacillus rhamnosus* X253 via Complete Genome and Phenotype Analysis. **Microorganisms**, v. 11, n. 1, p. 140, 2023.

ZHAO, R. *et al.* Purification and characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus rhamnosus* zrx01. **Food Bioscience**, v. 38, p. 100754, 2020.

ZHENG, J. *et al.* A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2782-2858, 2020.

ZHOU, Xingya *et al.* Comparative analysis of *Lactobacillus gasseri* from Chinese subjects reveals a new species-level taxa. **BMC genomics**, v. 21, n. 1, p. 1-16, 2020.

ZHU, Liyan *et al.* Structural basis of pore formation in the mannose phosphotransferase system by pediocin PA-1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 88, n. 3, p. e01992-21, 2022.

ZMORA, N. *et al.* Personalized gut mucosal colonization resistance to empiric probiotics is associated with unique host and microbiome features. **Cell**, v. 174, n. 6, p. 1388-1405. e21, 2018.



## Distribution of Genes Related to Probiotic Effects Across *Lactocaseibacillus rhamnosus* Revealed by Population Structure

Lorena Dutra-Silva<sup>1</sup> · Filipe P. Matteoli<sup>2</sup> · Ana Carolina Maisonnave Arisi<sup>1</sup>

Accepted: 19 October 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

### Abstract

The Gram-positive *Lactocaseibacillus rhamnosus* has been broadly reported as capable of exerting beneficial health effects. Bacterial genomic diversity may promote niche specialization, thus creating subpatterns within populations. As *L. rhamnosus* advantageous effects have been widely reported at strain level and few is known regarding the distribution of beneficial genes among *L. rhamnosus* strains, we investigated all publicly available genomes of *Lactobacillus* and *Lactocaseibacillus* genera to study the pangenome and general population structure of *L. rhamnosus*. Core genome multilocus sequence typing detected eight *L. rhamnosus* phylogroups (PG1 to PG8). *L. rhamnosus* harbors an open pangenome; PG1, PG3, PG4, and PG5 exhibited highly conserved gene distribution patterns. Genes significantly associated to the PG1, which comprises *L. rhamnosus* GG, are mainly phage-related. The adhesion operon *spaCBA-srtC1* was found in 44 (24.7%) genomes; however, considering only the PG1, the prevalence was of 65%. In PG2 the *spaCBA-srtC1* prevalence was of 43%. Nevertheless, both human and milk-derived strains harbored this operon. Further, two main types of bacteriocin clusters were found (Bact1 and Bact2). Bact1 predictions indicate the presence of *garQ*, encoding the class II bacteriocin garvieacin Q, that is mainly present in the closely related PG8A and a PG2 subcluster. PG2 harbors two distinct subclusters, harboring either *spaCBA-srtC1* or Bact1. Our findings provide novel insights on the distribution of biotechnological relevant genes across *L. rhamnosus* population, uncovering intra-species patterns that may bring forth the development of more efficient probiotic products.

**Keywords** Comparative genomics · Probiotic · Pilin · Motif conservation · Phylogroup · Bacteriocin

### Introduction

*Lactocaseibacillus rhamnosus* is a Gram-positive bacterium widely perceived as probiotic due to the broad range of beneficial applications in health, such as preventing vaginal dysbiosis [1], alleviating ulcerative colitis, [2] and reducing liver inflammation related to non-alcoholic fatty liver disease [3]. However, infections associated to *L. rhamnosus* have also been reported [4, 5]. In fact, a 5-year survey showed that ICU patients receiving *L. rhamnosus* GG (LGG) had higher

risk of developing *L. rhamnosus* bacteremia than those who received no probiotics [6].

Since the LGG description in 1989, a large number of other *L. rhamnosus* strains have been described as potential probiotics [7]. *L. rhamnosus* Lcr35 [8], *L. rhamnosus* MTCC-5897 [9, 10], and *L. rhamnosus* LOCK900 [11] are among the non-LGG strains, commonly classified as potential probiotics due to adhesion capabilities shown in cell culture tests or mice experiments. Nevertheless, the accumulation of clinical trials employing probiotics administration in controlled experiments outlined the paradigm that the beneficial effects are strain-specific [12]. This scenario along with the recent genome-wide taxonomy amendment in the *Lactobacillus* genus, which created the *Lactocaseibacillus* genus [13], constitutes an opportunity for in-depth comparative genomics studies of *L. rhamnosus*.

While many beneficial effects of *L. rhamnosus* usage as probiotics have been documented [7, 14], identifying the genes encoding proteins directly involved in these processes is not straightforward due to the plethora of mechanisms triggered by introduction of an exogenous live bacterial

✉ Filipe P. Matteoli  
matteolifilipe@gmail.com

Lorena Dutra-Silva  
dutralsorena@gmail.com

Ana Carolina Maisonnave Arisi  
ana.arisi@ufsc.br

<sup>1</sup> Food Science and Technology Department, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>2</sup> Department of Soil Science, Luiz de Queiroz College of Agriculture, Piracicaba, SP, Brazil

## ANEXO 2 – SUBMISSÃO DO ARTIGO DO CAPÍTULO III

02/02/2024, 17:32

Gmail - Journal of Applied Microbiology - Manuscript ID JAMICRO-2023-1141 [email ref: SE-6-a]



Lorena Dutra <dutraslorena@gmail.com>

---

### Journal of Applied Microbiology - Manuscript ID JAMICRO-2023-1141 [email ref: SE-6-a]

2 mensagens

---

**Journal of Applied Microbiology** <onbehalf@manuscriptcentral.com>  
Responder a: JAMBIO.editorialoffice@oup.com  
Para: ana.arisi@ufsc.br  
Cc: dutraslorena@gmail.com, matteolifilipe@gmail.com, ana.arisi@ufsc.br

22 de novembro de 2023 às 11:16

22-Nov-2023

Dear Prof. Ana Carolina Arisi,

Your manuscript entitled "OCCURRENCE AND STRUCTURE OF THE GENES ENCODING THE BACTERIOCIN GARVICIN Q IN *Lactocaseibacillus rhamnosus*" by Dutra Silva, Lorena; Matteoli, Filipe; Arisi, Ana Carolina, has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Journal of Applied Microbiology.

Co-authors: Please contact the Editorial Office as soon as possible if you disagree with being listed as a co-author for this manuscript.

Your manuscript ID is JAMICRO-2023-1141.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc.manuscriptcentral.com/jamicro> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Centre after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/jamicro>.

Thank you for submitting your manuscript to Journal of Applied Microbiology.

Sincerely,  
Journal of Applied Microbiology Editorial Office