

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA E POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE
BACTERIOCINAS EM *Ligilactobacillus salivarius*: UMA ANÁLISE
PANGENÔMICA E ESTRUTURAL

JOÃO VICTOR DOS ANJOS ALMEIDA

Trabalho apresentado à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de
Jaboticabal, para obtenção do título de Bacharel
em Ciências Biológicas

Jaboticabal – SP

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA E POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE
BACTERIOCINAS EM *Ligilactobacillus salivarius*: UMA ANÁLISE
PANGENÔMICA E ESTRUTURAL

JOÃO VICTOR DOS ANJOS ALMEIDA

Orientador: Prof. Dr. Alessandro de Mello Varani

Trabalho apresentado à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de
Jaboticabal, para obtenção do título de Bacharel
em Ciências Biológicas

Jaboticabal – SP
2º Semestre/2023

A447c

Almeida, João Victor dos Anjos

Caracterização genômica e potencial antimicrobiano de bacteriocinas em *Ligilactobacillus salivarius* : uma análise pangenômica e estrutural / João Victor dos Anjos Almeida. -- Jaboticabal, 2023

84 f. : il., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Alessandro de Mello Varani

1. Agentes antimicobacterianos. 2. Bacteriocinas. 3. Bioinformática. 4. Genômica. 5. Probióticos. I. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CÂMPUS DE JABOTICABAL

DEPARTAMENTO: BIOTECNOLOGIA AGROPECUÁRIA E AMBIENTAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TÍTULO: CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA E POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE BACTERIOCINAS EM *LIGILACTOBACILLUS SALIVARIUS*: UMA ANÁLISE PANGENÔMICA E ESTRUTURAL

ACADÊMICO: João Victor dos Anjos Almeida

CURSO: Ciências Biológicas

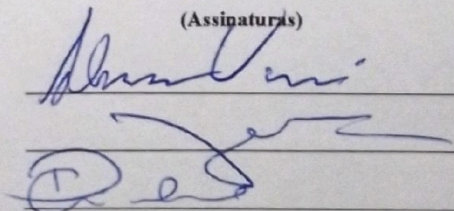
ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Alessandro de Mello Varani

Aprovado e corrigido de acordo com as sugestões da Banca Examinadora

BANCA EXAMINADORA:

	(Nomes)
Presidente	Prof. Dr. Alessandro de Mello Varani
Membro	Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro
Membro	Prof. Dr. Daniel Guariz Pinheiro

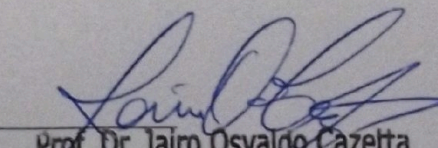
(Assinaturas)



Jaboticabal 04 / 12 / 2023

Aprovado em reunião do Conselho do Departamento em: 04 / 12 / 2023

Chefe do Departamento



Prof. Dr. Jairo Osvaldo Cazetta
Vice-Chefe do Depto. de Biotecnologia
Agropecuária e Ambiental

*Sonho que se sonha só
É só um sonho que se sonha só
Mas sonho que se sonha junto é realidade*

- Raul Seixas

Agradecimentos

À minha mãe, cujo apoio e amor foram fundamentais durante a jornada nesse curso, expresso minha gratidão por todo o encorajamento, que foi uma das grandes forças por trás da conclusão de minha formação.

Ao professor Alessandro que aceitou minha participação inicial em seu grupo de pesquisa e me proporcionou a possibilidade de participar em seus trabalhos, além de me ensinar a cada dia um pouco mais sobre a área acadêmica e me ajudar a trilhar o caminho que escolhi para a minha vida.

Aos meus queridos amigos membros e ex-membros do Grupo de Pesquisa em Genômica e Bioinformática de Plantas e Microrganismos (Edisson, Mauro, Julia e Rafaely), por compartilharem sempre um pouco de suas experiências e, acima de tudo, por serem companheiros no meu dia a dia acadêmico, dividindo risadas e conhecimentos. Bem como ao Lucas, que me ensinou e deixou que o acompanhasse em seu trabalho, permitindo-me conhecer todas as ferramentas necessárias para a execução do meu trabalho.

Aos demais professores que participaram da minha formação para além da sala de aula, o professor Francisco, com quem tive meu primeiro contato com estudos e atividades voltadas à bioinformática, além do Alison pelo apoio e paciência me guiando nos meus primeiros passos na pesquisa, o meu eterno agradecimento. Como também o professor Manoel Victor, que, por mais breve que tenha sido minha presença em seu grupo, foi o primeiro a me apresentar o campo de estudo que continuo a seguir.

Ao Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental (Unesp/FCAV), pela infraestrutura que possibilitou o desenvolvimento do meu projeto da melhor maneira que eu poderia esperar, além da presença de pessoas incríveis que tive o privilégio de cultivar relações memoráveis e dar vida a este laborioso empreendimento.

Aos meus amigos Felipe, Gabriel, Júlia e Mateus (os bambus), bem como aos demais colegas de turma que acompanharam toda minha trajetória e que, direta ou indiretamente, influenciaram nas minhas decisões.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de Iniciação Científica (2022/10612-2).

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Controle bacteriano.....	11
1.2 Bactérias ácido lácticas (BALs).....	15
1.3 Bacteriocinas.....	16
1.4 <i>Ligilactobacillus salivarius</i>	19
2 OBJETIVOS.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Obtenção das sequências genômicas de <i>Ligilactobacillus salivarius</i>	22
3.2 Anotação e Análise Pangenômica.....	22
3.3 Predição das áreas de interesse (AOI) e análises comparativas.....	23
3.4 Análise filogenômica.....	24
3.5 Modelagem molecular da bacteriocinas.....	24
4 RESULTADOS.....	25
4.1 Análise do pangenoma de <i>L. salivarius</i>	25
4.2 Anotação do pangenoma de <i>L. salivarius</i>	29
4.3 Alinhamento das predições.....	35
4.4 Modelagem molecular das bacteriocinas preditas para <i>L. salivarius</i>	39
4.5 Análise comparativa filogenômica.....	52
4.6 Genômica Comparativa das bacteriocinas preditas para <i>L. salivarius</i>	54
5 DISCUSSÃO.....	72
6 CONCLUSÃO.....	76
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

RESUMO

A descoberta e as aplicações terapêuticas dos antibióticos representaram marcos significativos, ao reduzirem infecções, além de aumentarem a expectativa de vida. No entanto, o uso excessivo dessas substâncias levou à seleção de cepas resistentes. Nesse contexto, as bacteriocinas surgem como uma alternativa segura e eficaz devido à sua atividade estável, especificidade e baixa toxicidade. Nesse sentido, o *Ligilactobacillus salivarius*, uma espécie reclassificada da família Lactobacillaceae, revela um alto potencial probiótico como produtora de bacteriocinas de classe 2 apenas. Investigar os aspectos moleculares se tornou necessário para confirmar os genes responsáveis pela produção das bacteriocinas em *L. salivarius*, especialmente diante do aumento de isolados sequenciados. Para alcançar esse objetivo, foram avaliados 216 genomas dessa espécie. Foi realizada a predição e tipificação das bacteriocinas utilizando a ferramenta BAGEL4. Posteriormente, ocorreu uma curadoria manual das sequências, seguida por uma análise pangenômica abrangente. Além disso, empregou-se o algoritmo AlphaFold2 para prever a estrutura 3D das proteínas. A análise dos genomas de *L. salivarius* revelou que a maioria das cepas apresentava alta completude e baixos níveis de contaminação (215 foram selecionadas dentre as 216 avaliadas). O pangenoma gerado foi composto por 6764 genes, apresentando, em média, 2,85 áreas de interesse (AOIs) por genoma, conforme previsto pelo BAGEL4. A análise filogenômica evidenciou um mecanismo dinâmico de aquisição e perda de bacteriocinas, independentemente das fontes de isolamento. Foram identificadas dezessete bacteriocinas presentes nas três classes bacteriocinas, revelando padrões e similaridades distintas em seus *loci* de síntese. É importante ressaltar a presença de uma possível bacteriocina, a enterolisina A, encontrada em associação com proteínas derivadas de bacteriófagos, embora apenas onze das bacteriocinas preditas possuam modelos correspondentes disponíveis. Os resultados encontrados neste estudo reforçam o potencial de *Ligilactobacillus salivarius* como agente antimicrobiano direcionado contra a resistência bacteriana tanto na saúde pública quanto na produção animal. A identificação de diversos componentes proteicos bacteriocinogênicos destaca a necessidade de mais pesquisas para compreender a dinâmica genética subjacente e explorar possíveis aplicações socioeconômicas.

Palavras-chave: bacilos ácidos-lácticos (BALs); bacteriocinas; bioinformática; biomoléculas antimicrobianas.

ABSTRACT

The discovery and therapeutic applications of antibiotics have represented significant milestones by reducing infections and increasing life expectancy. However, the excessive use of these substances has led to the selection of resistant strains. In this context, bacteriocins emerge as a safe and effective alternative due to their stable activity, specificity, and low toxicity. In this regard, *Ligilactobacillus salivarius*, a reclassified species of the Lactobacillaceae family, reveals a high probiotic potential as a producer of class 2 bacteriocins only. Investigating molecular aspects has become necessary to confirm the genes responsible for bacteriocin production in *L. salivarius*, especially in the face of an increase in sequenced isolates. To achieve this goal, 216 genomes of this species were evaluated. Prediction and typing of bacteriocins were performed using the BAGEL4 tool. Subsequently, manual curation of sequences occurred, followed by a comprehensive pangenomic analysis. Additionally, the AlphaFold2 algorithm was employed to predict the 3D structure of proteins. Genomic analysis of *L. salivarius* revealed that most strains had high completeness and low contamination levels (215 were selected out of the 216 evaluated). The generated pangenome consisted of 6764 genes, with an average of 2.85 areas of interest (AOIs) per genome, as predicted by BAGEL4. Phylogenomic analysis revealed a dynamic mechanism of acquisition and loss of bacteriocins, regardless of isolation sources. Seventeen bacteriocins were identified across the three bacteriocin classes, revealing distinct patterns and similarities in their synthesis *loci*. It is important to note the presence of a possible bacteriocin, enterolisin A, found in association with phage-derived proteins, although only eleven of the predicted bacteriocins have corresponding available models. The results of this study reinforce the potential of *Ligilactobacillus salivarius* as an antimicrobial agent targeted against bacterial resistance in both public health and animal production. The identification of various bacteriocinogenic protein components underscores the need for further research to understand the underlying genetic dynamics and explore possible socio-economic applications.

Keywords: lactic acid bacteria (LABs); bacteriocins; bioinformatics; antimicrobial biomolecules.

1 INTRODUÇÃO

A incorporação de antibióticos nas abordagens de tratamento clínico representou um marco significativo na medicina ao longo do século XX (Katz; Baltz, 2016). A utilização desses compostos químicos, provenientes tanto de fontes naturais como sintéticas, para controlar microrganismos - especialmente bactérias - através da indução da morte celular (bactericida) ou da interrupção do seu crescimento (bacteriostático), estabeleceu-se como um pilar fundamental no tratamento de doenças infecciosas (Sengupta; Chattopadhyay; Grossart, 2013).

Além disso, a aplicação desses antibióticos em doses sub-terapêuticas foi amplamente empregada na pecuária com o propósito de reduzir infecções bacterianas, aprimorar a eficiência alimentar e o crescimento dos animais, além de servir como promotores de crescimento (Niewold, 2007). Contudo, o uso excessivo dessas substâncias, tanto em seres humanos quanto em animais, resultou na disseminação de linhagens bacterianas resistentes por meio de mecanismos de seleção (Ayukekbong; Ntemgwa; Atabe, 2017).

Ainda no âmbito da aplicação na agropecuária, a utilização excessiva desses medicamentos também acaba resultando na diminuição da microbiota intestinal, o que, por sua vez, leva a uma redução na síntese de metabólitos, prejudicando assim os animais (Kirchelle, 2018). Nesse contexto, como destacado por Mulani *et al.* (2019), a implementação de abordagens não antibióticas, como bacteriófagos, peptídeos antimicrobianos (AMPs) e até mesmo nanomedicamentos, se torna uma estratégia adicional no controle de patógenos. Essas alternativas surgem como meios de lidar com a intensa pressão seletiva e de reduzir o surgimento de cepas resistentes ou multirresistentes.

Nesse cenário, os peptídeos com capacidade e ação antibiótica, sintetizados ribossomicamente e conhecidos como bacteriocinas, apresentam um grande potencial devido à sua atividade estável, especificidade caracterizada e baixa toxicidade (Gradisteanu Pircalabioru, 2021). As bacteriocinas são predominantemente produzidas por bactérias Gram-positivas, com destaque para o grupo das bactérias ácido-láticas (BALs) (Mozzy; Raya; Vignolo, 2010). Esses peptídeos estão sendo aproveitados em diversas indústrias, como a de

conservação de alimentos (Felicio *et al.*, 2015), principalmente porque são sintetizados para eliminar ou inibir o crescimento de outras bactérias, atuando como uma forma de autopreservação e/ou vantagem competitiva (Preciado *et al.*, 2016).

Assim, como proposto por Todorov *et al.* (2020), torna-se imprescindível conduzir investigações moleculares aprofundadas para verificar a presença e a variabilidade de genes relacionados à produção de bacteriocinas. Essa necessidade é ainda mais substanciada devido ao aumento constante no número de novos isolados sequenciados, resultando em bancos de dados em constante crescimento, repletos de informações cruciais a serem analisadas (Hammami *et al.*, 2010).

Portanto, este estudo teve como objetivo empregar diversas ferramentas de bioinformática, bem como bancos de dados e métodos de genômica comparativa, a fim de prever as possíveis bacteriocinas que podem ser encontradas em *Ligilactobacillus salivarius*, buscando compreender a dinâmica e a evolução desses genes dentro desse grupo de bactérias ácido-láticas.

1.1 Controle bacteriano

Ao longo da história científica, um dos principais marcos do século XX foi a descoberta dos antibióticos e suas aplicações terapêuticas no enfrentamento de diversas doenças. Isso abriu caminho para o aumento da expectativa de vida e para avanços significativos no tratamento de infecções microbianas (Mohr, 2016).

No entanto, desde então, o uso inadequado e excessivo de compostos antimicrobianos desempenhou um papel crucial na seleção e desenvolvimento de gerações que apresentam resistência aos fármacos amplamente utilizados em todo o mundo (Shallcross; Davies, 2014). Isso resultou na imunidade de inúmeras bactérias patogênicas e oportunistas aos antibióticos. Esse cenário ressaltou a necessidade premente de desenvolver abordagens diversas para o tratamento eficaz de doenças infecciosas (Wang *et al.*, 2020).

Nesse contexto, os probióticos surgem como uma alternativa viável e segura em comparação aos antibióticos. Essa proposta surge dentre as abordagens distintas ao método tradicional para enfrentar as pressões seletivas

causadas pelos antibióticos, resultando em uma maior resistência a diversos patógenos e aprimorando a eficácia da proteção intestinal nos animais, conforme destacado por Ashaolu (2020). Essa relevância decorre do aumento global da preocupação com o surgimento de bactérias resistentes aos antibióticos, o que gera um interesse cada vez maior na exploração de alternativas, como é o caso dos probióticos.

Dessa forma, probióticos são caracterizados como "microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades apropriadas, proporcionam benefícios à saúde do hospedeiro" (Hill *et al.*, 2014). Esses microrganismos, majoritariamente bactérias ou leveduras, podem ser encontrados em alimentos específicos, como produtos lácteos fermentados, assim como em suplementos alimentares. Os gêneros mais frequentemente utilizados para a produção de probióticos são: *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Zhang *et al.*, 2020).

Em tal âmbito, é importante ressaltar que entre esses fatores, os microrganismos probióticos possuem uma definição estabelecida pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (2006), sendo reconhecidos como microrganismos viáveis capazes de conferir vantagens à saúde de seus hospedeiros. Os probióticos promovem seus efeitos benéficos por meio de uma variedade de mecanismos, incluindo:

- I. Exclusão Competitiva: Competem com as bactérias patogênicas no intestino, impedindo sua colonização (Bang *et al.*, 2022). Assim, esse mecanismo acaba sendo fundamental através do qual os microrganismos probióticos exercem sua influência positiva na saúde intestinal. Esse processo se desenrola quando os probióticos, ao serem introduzidos no trato gastrointestinal, entram em concorrência direta com as bactérias patogênicas presentes, evitando a colonização desses indivíduos nocivos (Barzegari *et al.*, 2020). A disputa se concentra principalmente em relação aos nutrientes essenciais e aos sítios de ligação disponíveis no ambiente intestinal (Bang *et al.*, 2022).

- II. Modulação da Resposta Imune: Estimulam o sistema imunológico, aumentando a produção de anticorpos e melhorando a defesa contra infecções (Lu; Wang; Wu, 2022). A ação dos probióticos na modulação da resposta imune envolve uma ampla gama de interações entre os microrganismos e as células do sistema imunológico, como os macrófagos e os linfócitos (Azad *et al.*, 2018). Essas interações desencadeiam uma cascata de eventos que culminam no aumento da produção de anticorpos, que são proteínas vitais para o combate eficaz de infecções. Além de estimular a produção de anticorpos, os probióticos também influenciam a atividade dos linfócitos T, células cruciais para a coordenação da resposta imune, resultando em uma resposta imune mais regulada e eficiente (Azad *et al.*, 2018).
- III. Produção de Substâncias Antimicrobianas: Algumas cepas probióticas produzem substâncias antimicrobianas, como bacteriocinas, que inibem o crescimento de bactérias patogênicas (Pereira *et al.*, 2022).
- IV. Reforço da Barreira Intestinal: Fortalecem a barreira intestinal, promovendo a produção de muco (que desempenha um papel crucial na defesa contra bactérias patogênicas, capturando esses microrganismos prejudiciais e impedindo que eles alcancem as células intestinais) e proteínas de junção (que são responsáveis por manter as células intestinais unidas e formar uma barreira física entre o interior do intestino e o restante do corpo), reduzindo a capacidade das bactérias nocivas de penetrar na parede intestinal (Gou *et al.*, 2022).

Além de sua aplicação na medicina humana, a intensificação da agricultura animal, aliada ao uso indiscriminado de antibióticos como impulsionadores de crescimento, trouxe consigo uma segunda área de agravamento no tocante à resistência microbiana a esses compostos. Essa resistência, sobretudo entre os microrganismos patogênicos, foi acentuada. Nesse contexto, os probióticos se

destacam como uma alternativa aos tradicionais impulsionadores de crescimento na produção animal (Arsène *et al.*, 2021).

Os mecanismos que historicamente foram descritos como impulsionadores do crescimento por meio do uso de antibióticos podem ter sua caracterização descrita por Niewold (2007). O autor apresenta esse fatores como capazes de controlar infecções subclínicas, uma vez que doses baixas de antibióticos conseguem suprimir infecções bacterianas subclínicas, que são comuns em animais criados em sistemas intensivos. Ao reduzir a carga microbiana e a resposta imunológica associada, os animais podem alocar uma quantidade maior de energia para o crescimento.

Além disso, os antibióticos também seriam capazes de reduzir a inflamação intestinal, o que pode ser benéfico para o crescimento. Isso ocorre ao diminuir a abundância de bactérias pró-inflamatórias ou ao influenciar diretamente as respostas imunológicas. Essa redução da inflamação contribui para um aumento na absorção e na utilização de nutrientes, facilitando, assim, o processo de crescimento. É interessante notar que esse modelo de ação, proporcionado pelos antibióticos, também pode ser replicado por meio da manipulação de probióticos.

Tarradas *et al.* (2020) discutem como os probióticos podem desempenhar um papel semelhante ao dos antibióticos nesse contexto. Esses microrganismos benéficos têm o potencial de modular a microbiota intestinal, reduzir a inflamação e influenciar positivamente as respostas imunológicas. Assim como os antibióticos, os probióticos podem contribuir para a redução das infecções subclínicas e para a melhoria da absorção de nutrientes. Portanto, a manipulação de probióticos oferece uma abordagem promissora para alcançar resultados comparáveis aos obtidos por meio dos antibióticos, mas de maneira mais sustentável e amigável ao ecossistema.

Contudo, a falta de especificidade no mecanismo de ação dos antibióticos acabam sendo passivas a provocarem alterações negativas na microbiota do organismo ao qual estão sendo mediadas (Zhang; Chen, 2019). Isso pois, há muitas interações benéficas entre os macro e microrganismos, principalmente na produção de metabólitos no trato gastrointestinal desses indivíduos, o que pode limitar as vantagens acima citadas (Chen *et al.*, 2022). Além disso, o uso não

direcionado pode levar a seleção de cepas resistentes que significam um risco para a saúde desses indivíduos. Por isso, a ação mais específica promovida por probióticos é mais vantajosa levando em consideração essa abordagem (Nalla *et al.*, 2022).

O valor prático também é refletido no mercado relacionado a sua produção, estimando-se que o mercado global de probióticos esteja avaliado em \$57,8 bilhões de dólares em 2022, com previsões que este valor atinja US \$85,4 bilhões até 2027 (Research and Markets, 2022).

1.2 Bactérias ácido lácticas (BALs)

As bactérias ácido lácticas são um grupo de microrganismos que produzem ácido láctico como principal produto metabólico durante a fermentação (Wang *et al.*, 2021). Devido à acidificação, esses indivíduos já encontram-se descritos na literatura científica por serem capazes de evitar a deterioração dos alimentos e o crescimento de agentes patogênicos (Hammes; Weiss; Holzapfel, 1992).

Devido a essa ação biológica, as BALs desempenham um papel importante e útil como material de partida em múltiplas aplicações, incluindo indústrias alimentícias, químicas, cosméticas, farmacêuticas e de bebidas, devido às suas diversas propriedades funcionais (Bangar *et al.*, 2022). Essas bactérias são amplamente utilizadas na produção e preservação de alimentos fermentados, como iogurte, queijos, carnes entre outros alimentos (Barcenilla *et al.*, 2022).

O genoma das bactérias lácticas pode variar em tamanho, com valores entre 1,15038 e 4,87232 Mb, e em média, elas contêm aproximadamente 2.000 genes (König; Fröhlich, 2017). Além disso, essas bactérias apresentam plasmídeos, tanto circulares quanto lineares, que estão relacionados com processos como a fermentação de carboidratos, atividades proteicas, produção de bacteriocinas, mecanismos de proteção contra fagos e métodos de resistência a antibióticos (Morelli; Von Wright, 2019).

As BALs formam um grupo diverso de microrganismos anaeróbios facultativos tolerantes a ácidos e organismos fermentativos, do qual podem ser encontradas bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Enterococcus* e *Leuconostoc* (Mozzy; Raya; Vigolo,

2010). De maneira geral, as BALs ocorrem naturalmente em meios que apresentam um rico suprimento nutricional em sua composição (König; Fröhlich, 2017). Esses indivíduos podem então acabar estando presentes em materiais sob estado de decomposição de origem vegetal, em laticínios, produtos agrícolas como beterrabas, batatas, legumes em conserva, silagem e bebidas (König; Fröhlich, 2017). Além disso, podem ser encontradas difundidas em tecidos distintos dos animais como nos tratos gastrointestinal e urogenital de humanos e animais, bem como no solo e água (Ruiz Rodríguez *et al.*, 2019).

No entanto, algumas bactérias ácido lácticas podem ser patogênicas e causar doenças em humanos, como *Lactobacillus delbrueckii* sub. *bulgaricus*, que pode causar infecções prejudiciais em casos específicos envolvendo pessoas com sistema imunológico comprometido (Cosimi *et al.*, 2015; Korkmaz Kirakli; Oztekin, 2017).

1.3 Bacteriocinas

As bacteriocinas podem ser entendidas como uma categoria extremamente variada de peptídeos bactericidas que são produzidos por bactérias e arqueas. Dentro desta classe, existem cerca de 230 moléculas distintas, com aproximadamente 89% delas sendo sintetizadas por bactérias Gram-positivas, enquanto apenas uma minoria, representada por 19 casos, é produzida por bactérias Gram-negativas (Hammami *et al.*, 2010; Dobson *et al.*, 2012). Essa diversidade é resultado de distintos fatores, incluindo a origem genética, características bioquímicas, peso molecular, receptores celulares e interações com o sistema imunológico dos organismos alvo (Mokoena, 2017).

Esses componentes são encontrados em determinadas linhagens de bactérias, como é o caso das BALs, e possuem a capacidade de inibir o crescimento e eliminar microrganismos próximos ou distantes em termos taxonômicos (Riley; Wertz, 2002). Inclusive, podem ser tóxicas para os próprios indivíduos que as sintetizam, e estes, por outro lado, se defendem por meio de um conjunto de proteínas de imunidade. Isso resulta em um mecanismo de proteção específico para as cepas intimamente relacionadas às bactérias produtoras (Oppegård *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2014).

Comparado ao uso tradicional de antibióticos, uma das características notáveis das bacteriocinas é sua marcante estabilidade em uma variedade ampla de condições físico-químicas (Perez; Zendo; Sonomoto, 2014). Essa característica implica que elas mantêm sua eficácia mesmo em ambientes desafiadores, tais como os encontrados no corpo humano ou durante o processamento de alimentos. Tal resiliência torna as bacteriocinas ainda mais atrativas para exploração e desenvolvimento de métodos de controle microbiano. A razão é que elas podem ser aplicadas em uma gama diversificada de cenários, em contraste com os antibióticos convencionais, que podem demonstrar menor eficácia sob certas circunstâncias.

A classificação definitiva dessas moléculas mostra-se, com base na investigação bibliográfica, um fator ainda em discussão, apresentando distinções a depender dos autores que compreendem distintos padrões em relação a subdivisão do grupo proteico.

Segundo as tendências mais recentes, as bacteriocinas sintetizadas por bactérias Gram-positivas podem ser categorizadas em: classe I compreendendo pequenos peptídeos pós-traducionalmente modificados, subdivididos em classe Ia (lantibióticos), classe Ib (labirintopeptinas) e classe Ic (santibióticos); classe II abrigando peptídeos pequenos, estáveis ao calor e não pós-traducionalmente modificados, que podem ser subdivididas em bacteriocinas da classe IIa (do tipo pediocina), classe IIb (bacteriocinas não modificadas formada por dois peptídeos), classe IIc (bacteriocinas circulares) e classe IId (bacteriocinas não modificadas, lineares e não semelhantes a pediocinas); e classe III com peptídeos termolábeis maiores que 10 kDa (Darbandi *et al.*, 2022).

Tabela 1. Classes de bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas.

Classe	Exemplo	Mecanismo de ação	Propriedades físico-químicas
I	Ia	Nisina	Causa permeabilização membranar ao inibir sua síntese ou por meio da formação de poros
	Ib	Mersacidina	Esses peptídeos podem inibir enzimas catalíticas essenciais para a sobrevivência de bactérias suscetíveis
	Ic	Thuricina CD	Ainda não elucidado
II	IIa	Enterocina e Sakacina G	Permeabilização da membrana por formação de poros
	IIb	Salivaricina P, Lactacina-F e Plantaricin NC8	Permeabilização da membrana por formação de poros
	IIc	Acidocina B	Permeabilização da membrana por formação de poros
	IId	Bacteriocina LS2 cadeia A e B	Permeabilização da membrana por formação de poros
III	Helveticina J e Enterolisina A	Pode perturbar a captação de glicose pelas células e perturbar o potencial de membrana a catalisando por hidrólise	Peptídeos hidrofílicos sensíveis ao calor (>10 kDa). O C-terminal contém um sítio de reconhecimento para a célula alvo, enquanto o N-terminal tem homologia com endopeptidases envolvidas na síntese da parede celular.

* Adaptado de Kumariya *et al.* (2019), Meade, Slattery e Garvey (2020), Simons, Alhanout e Duval (2020).

A sensibilidade às bacteriocinas está diretamente ligada à capacidade desses compostos de interagir com a superfície celular, utilizando a permeabilidade ao citoplasma e a formação de poros como seus principais mecanismos (Dicks *et al.*, 2018). A maioria das bacteriocinas possui características catiônicas e dimensões inferiores a 10 kDa. Essa combinação de pequeno tamanho e carga, juntamente com variações nas propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas, permite a elas se aderirem às células microbianas e atravessarem membranas fosfolipídicas.

Como resultado, induzem a formação de poros nas membranas das células alvo, causando danos às células bacterianas. Esse processo impacta a integridade do ADN/ARN, a síntese de proteínas, a formação da parede celular e a atividade enzimática (Meade; Slaterry; Garvey, 2020).

Embora a atividade antimicrobiana das bacteriocinas seja reconhecida há algum tempo, o exato modo de ação de muitos desses peptídeos ainda permanece parcialmente esclarecido (Meade; Slaterry; Garvey, 2020).

Outros mecanismos de ação observados, acabam sendo exemplificados com os lantibióticos globulares das bacteriocinas classe I que atuam na inibição de enzimas essenciais da célula-alvo, enquanto as bacteriocinas classe III têm suas atividades através da lise de células sensíveis catalisando a hidrólise da parede celular (Gabrielsen *et al.*, 2014).

1.4 *Ligilactobacillus salivarius*

Anteriormente denominado como *Lactobacillus salivarius*, a espécie *Ligilactobacillus salivarius* trata-se de uma bactéria gram positiva que produz apenas ácido lático do metabolismo de carboidratos, sendo encontrada naturalmente entre outras fontes, em tecidos - cavidade oral, trato gastrointestinal e urogenital (Pino *et al.*, 2019) - e secreções - leite (Martín *et al.*, 2006, Guerrero Sanchez *et al.*, 2021).

Devido a recente reclassificação da família Lactobacillaceae - a fim de fornecer uma taxonomia estável, essencial para a pesquisa acadêmica, mas também para fins médicos, nutricionais e ambientais - a classificação do grupo foi recentemente revisada, *L. salivarius* deixou o gênero *Lactobacillus* para a

constituição do novo táxon, *Ligilactobacillus*, apresentando-se como agrupamento contendo 16 espécies de microrganismos com estilo de vida adaptado ao hospedeiro vertebrado (Zheng *et al.*, 2020).

Nesse contexto, os *L. salivarius*, é caracterizado como probiótico benéfico para o sistema imunológico de suínos (Zhou *et al.*, 2020) e também relacionados com a saúde humana apresentando bons resultados em distúrbios alérgicos e doenças de pele (Guerrero Sanchez *et al.*, 2021).

Em relação a síntese de bacteriocinas não modificadas das subclasses Ila, Ilb e Ild, elas têm demonstrado melhorar o estado imunológico e reduzir a colonização por bactérias patogênicas na avicultura e suinocultura, favorecendo o aumento da produção animal (O'shea *et al.*, 2011). Portanto, *L. salivarius* é considerada uma promissora espécie de alto potencial probiótico (Kumar, 2022).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar, anotar e comparar genes relacionados com a síntese de bacteriocinas em *Ligilactobacillus salivarius*.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a análise pangenômica de *L. salivarius* com enfoque na predição e estimativa da diversidade de bacteriocinas nesta espécie;
- Comparar, utilizando uma abordagem filogenética, as sequências de bacteriocinas nas espécies de *L. salivarius* frente aos diferentes nichos de isolamento;
- Investigar através da genômica comparativa das regiões codificadoras de bacteriocinas, com a finalidade de propor quais os mecanismos genéticos estão associados com a aquisição destes genes;
- Contribuir com a predição por homologia e comparação da estrutura protéica das bacteriocinas identificadas e anotadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das sequências genômicas de *Ligilactobacillus salivarius*

A obtenção das sequências genômicas envolveu um processo detalhado de pesquisa. Inicialmente, realizamos um levantamento de genomas relacionados à espécie *L. salivarius* por meio da plataforma "Genomes – NCBI Datasets" (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genomes/>). Essa etapa foi crucial para coletar um conjunto representativo de dados genômicos que seriam fundamentais para o nosso estudo.

Após a coleta dos 216 genomas, nossa atenção se voltou para a avaliação da qualidade desses dados. Utilizamos a ferramenta CheckM v1.2.1 (Parks *et al.*, 2015) para conduzir uma análise criteriosa. Nossa avaliação se concentrou em dois aspectos essenciais: a completude e o grau de contaminação de cada genoma. Definimos rigorosos padrões de qualidade, estabelecendo que os genomas selecionados deveriam apresentar, no mínimo, 80% de completude e um máximo de 10% de contaminação.

Esses critérios de seleção são fundamentais para garantir a integridade e a confiabilidade dos dados genômicos que seriam utilizados em nosso estudo. Através desse processo de obtenção e avaliação das sequências genômicas, pudemos estabelecer uma base para a pesquisa, assegurando a qualidade e a representatividade dos dados utilizados em nosso trabalho.

3.2 Anotação e Análise Pangenômica

Uma vez concluída a filtragem das sequências genômicas, seguimos para a etapa de anotação utilizando a ferramenta Prokka v1.14.6 (Seemann, 2014). Essa fase é de extrema importância, pois a anotação genômica fornece informações valiosas sobre os genes presentes nas sequências, suas funções e suas localizações no genoma. Essas anotações detalhadas servem como alicerce para análises subsequentes e ajudam a compreender a diversidade genética da espécie *L. salivarius*.

Com as anotações genômicas em mãos, prosseguimos com a determinação do pangenoma da *L. salivarius*. Para isso, utilizamos o Panaroo v1.3.0 (Tonkin-Hill *et al.*, 2020), uma ferramenta especializada em identificar o

conjunto de genes presentes em todas as cepas de uma mesma espécie, conhecido como o pangenoma. Além disso, empregamos a ferramenta Panstripe (Tonkin-Hill *et al.*, 2023) para realizar uma análise minuciosa das taxas de ganho e perda de genes ao longo da evolução, revelando informações cruciais sobre a dinâmica genômica da *L. salivarius*.

Para enriquecer ainda mais nossa análise, compilamos informações complementares referentes aos genomas em um conjunto de dados abrangente. Essas informações incluíam detalhes sobre a origem, a cepa, a completude e a contaminação de cada genoma, que foram organizadas e apresentadas na Tabela Suplementar. Essa tabela serviu como um recurso de referência valioso ao longo da pesquisa, proporcionando contexto e informações adicionais sobre os genomas estudados.

3.3 Predição das áreas de interesse (AOI) e análises comparativas

A ferramenta BAGEL4 (<http://bagel4.molgenrug.nl/>) (Van Heel *et al.*, 2018) foi utilizada para a predição das regiões codificadoras de bacteriocinas, sendo essas as sequências alvo de interesse para este estudo.

O processo de predição é guiado pelos domínios proteicos identificados, sendo assim analisada as regiões/áreas de interesse (AOI), contando com um banco de dados que apresenta classificações para bacteriocinas em três grupos: classe 1 (modificadas); classe 2 (não modificadas) e classe 3 (>10 kD). As bacteriocinas identificadas foram alinhadas pelo programa MAFFT v7.487 (Katoh; Standley, 2013) e os domínios e motivos proteicos de cada bacteriocina identificada foram visualizados pelo *CLC Genomics Workbench 22.0* (QIAGEN).

A sintonia das AOI foi determinada usando a ferramenta clinker & clustermap.js v0.0.27 (Gilchrist; Chooi, 2021) considerando um banco de dados construído a partir do repertório utilizado pelo BAGEL4, como também dados referentes ao ADN plasmidial presente no NCBI (<https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/refseq/plasmid/>) para maximizar a anotação. As imagens geradas foram então editadas manualmente com o Inkscape (<https://inkscape.org>).

3.4 Análise filogenômica

A análise filogenômica de *L. salivarius*, foi inferida por meio dos genes centrais de cópia única identificados com BUSCO v5.4.2 (Simão, 2014), com base no banco de dados *lactobacillales_odb10*.

Os resultados obtidos neste procedimento foram utilizados para a construção de uma supermatriz com a pipeline BUSCO_Phylogenomics (https://github.com/jamiemcg/BUSCO_phylogenomics). A árvore filogenômica de máxima verossimilhança (ML) foi construída usando IQ-TREE v2.1.3 (Nguyen, 2015) pelo modelo WAG+F+R7 de acordo com os critérios AIC (Akaike, 1974), por meio do software ModelFinder (Kalyaanamoorthy *et al.*, 2017) incluído no IQ-TREE com 1.000 réplicas rápidas de bootstrap. As cepas de *Lactococcus lactis* G121 (NZ_CP053671.2), UC11 (NZ_CP015904.1), II1403 (AE005176.1) e KF147 (NC_013656.1) foram usadas como grupo externo. O desenho da árvore foi realizado pelo iTOL v5 (Letunic; Bork, 2021), sendo associados os metadados genômicos coletados e anotações como recursos externos.

3.5 Modelagem molecular da bacteriocinas

Para a modelagem das bacteriocinas identificadas por nosso estudo, utilizamos o algoritmo AlphaFold 2 (Jumper *et al.*, 2021), que é capaz de prever a estrutura tridimensional de proteínas com alta precisão a partir de sua sequência de aminoácidos. Para refinar as modelagens obtidas a *web* ferramenta GalaxyRefine (Heo; Park; Seok, 2013), que é capaz de melhorar a precisão das estruturas de proteínas geradas por outros softwares de modelagem, foi utilizada.

A predição estrutural da bacteriocinas foi avaliada pela submissão da mesma a plataforma SAVES 6.0 (<https://saves.mbi.ucla.edu/>) e análise do gráfico de Ramachandram, gerado com PROCHECK para análise de qualidade estereoquímica (Laskowski *et al.*, 1993; Paul; Saikat, 2021). Além disso, as características físico-químicas das bacteriocinas foram preditas por meio da ferramenta ProtParam (Wilkinson *et al.*, 1992).

4 RESULTADOS

4.1 Análise do pangenoma de *L. salivarius*

Foram obtidos 216 genomas de *L. salivarius* apresentando casos onde encontram-se unicamente armazenados no repositório do GenBank/Refseq. A qualidade da montagem desses genomas variou desde o nível scaffold até genomas completos. Ao analisar a origem dos isolados, foi possível observar que grande parte foi oriundo de estudos realizados na China (87), Coreia do Sul (55), Estados Unidos (22), Japão (9), República Tcheca (7), Espanha (4), Rússia (3), Reino Unido (3), Canadá (3), França (2), Taiwan (2), Dinamarca (2), Alemanha (2), Áustria (1), Moçambique (1), Irlanda (1), Tunísia (1), Itália (1), Argentina (1), Chile (1), Tailândia (1), Polônia (1), Cazaquistão (1), Índia (1), Eslovênia (1) e dois casos não identificados.

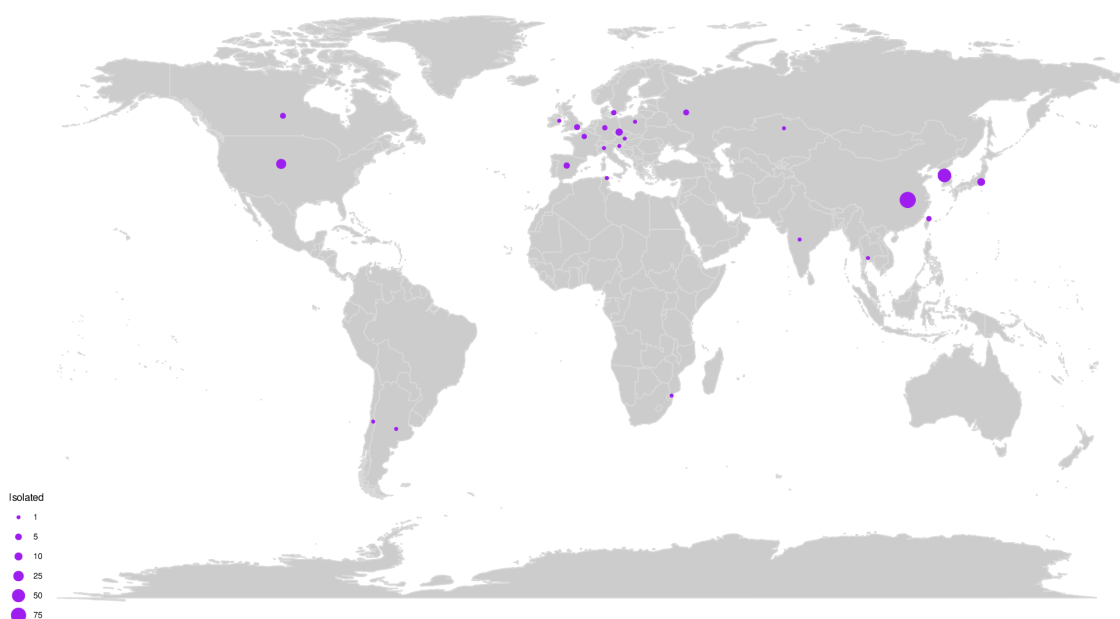


Figura 1. Distribuição dos genomas de *L. salivarius* depositados no banco de consultado. Fonte: o autor, 2023.

As análises comparativas referentes aos 216 genomas de *L. salivarius* encontrados mostraram um conjunto de dados que incluiu 22 genomas completos, os quais apresentaram uma completude média de 99,33%. Além

disso, também foram analisados 194 genomas em estágio inicial de montagem, que apresentaram uma completude média de 98,85%. Desse total, identificamos 21 desses genomas com montagens de plasmídeos, em um total de 21. No entanto, um dos genomas draft demonstrou uma contaminação significativa, com uma taxa superior a 30%. Em média, temos 1766,64 genes por genoma de *L. salivarius*. Esses resultados fornecem uma visão abrangente da diversidade genômica presente nessa amostra.

Como dito anteriormente, após a checagem em relação aos dados de completude e contaminação dos genomas, 215 cepas foram elencadas como aptas para darem continuidade às análises e, conseqüentemente, montagem do pangenoma para *L. salivarius*.

O pangenoma de referência da espécie é composto por 6.764 genes, sendo que 903 genes pertencentes ao grupo de *core genes*. Além disso, foram classificados 406, 1031 e 4424 genes como sendo pertencentes ao grupo de *soft-core genes*, *shell genes* e *cloud genes*, respectivamente. Através da observação da curva de acumulação apresentada (Figura 3A) pode-se argumentar, mesmo com um aparente quadro estável de ganho e perda de genes visualizado de forma seguida do gráfico filogenético das cepas (Figura 3B), que há um cenário de pangenoma aberto.

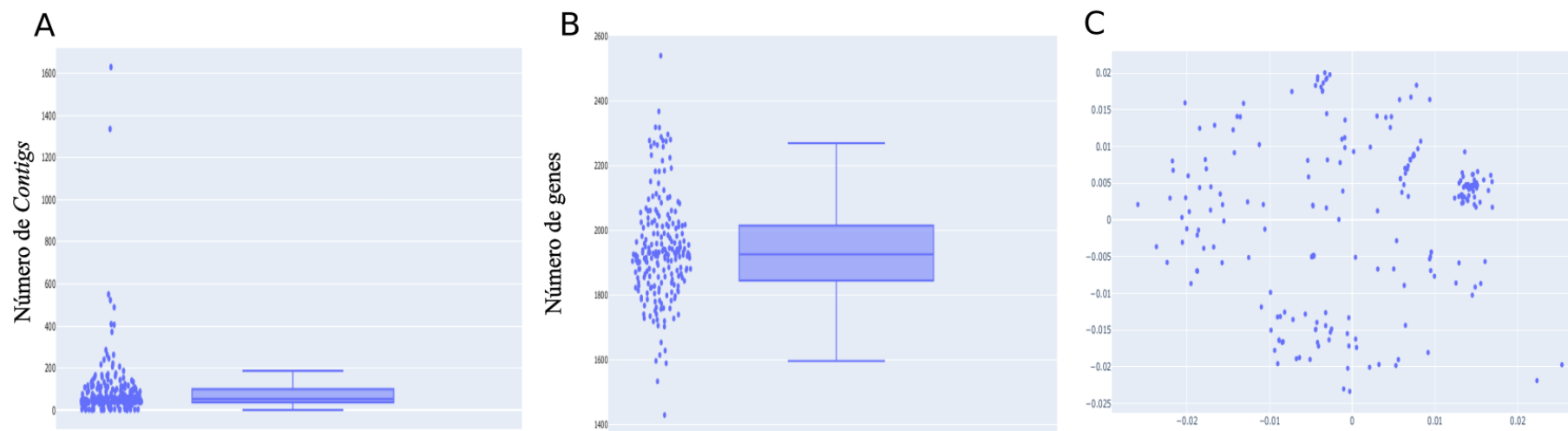


Figura 2. Resultados obtidos pelo pré e pós processamento do pangenoma de *L. salivarius*. Nos gráficos A e B podemos notar, respectivamente, a distribuição no número de scaffolds/contigs e a distribuição no número de genes entre as cepas trabalhadas. Já no gráfico C, uma projeção frente uma escala multidimensional das distâncias de Mash aos pares, indicando uma forte ligação entre os genomas analisados, reforçando a confiabilidade em relação a classificação de tais cepas. Fonte: o autor, 2023.

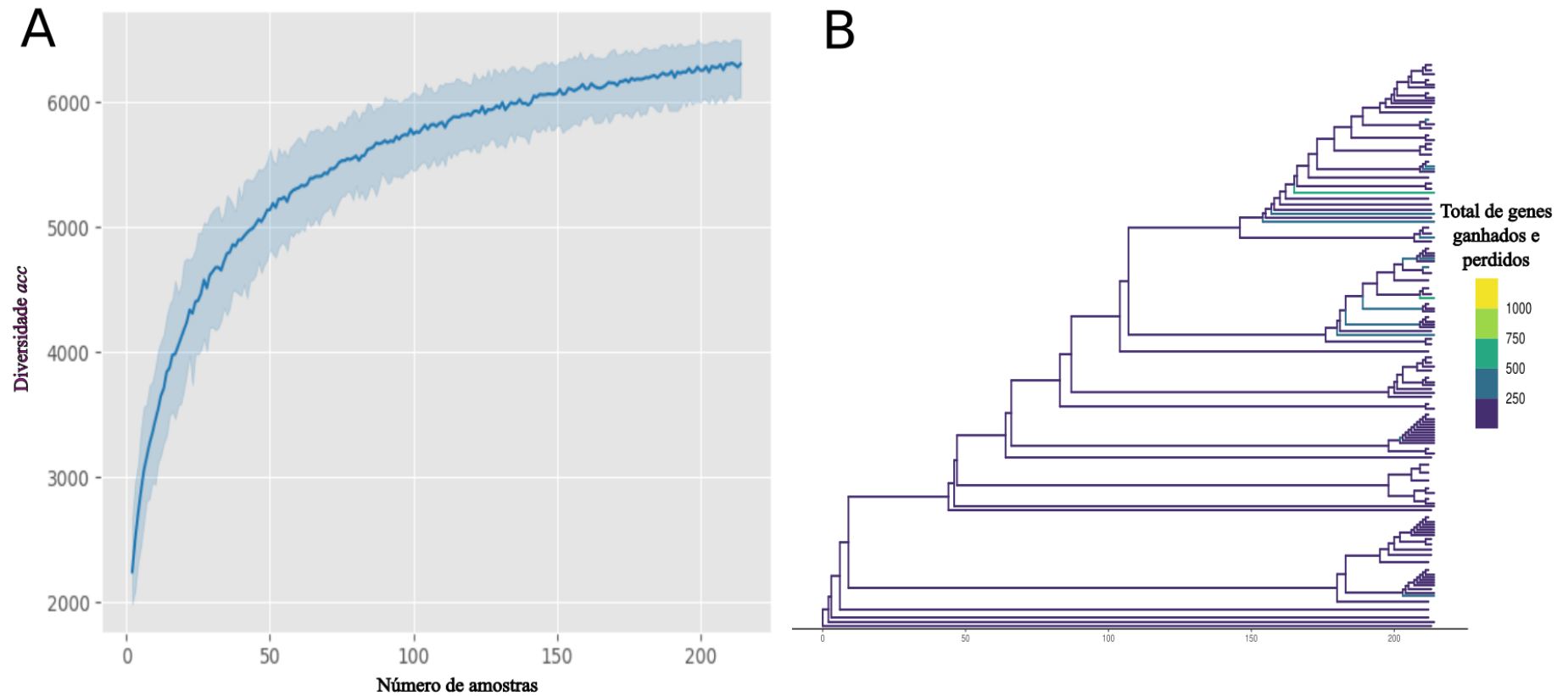


Figura 3. Em A, encontra-se a curva de acumulação de pangenomas que indica a diversidade acessória em função do número de novas amostras - genomas - adicionados. Já em B, nota-se a associação gráfica entre a filogenia de *L. salivarius* e processos de ganho e perda de genes, que indicam uma certa estabilidade mesmo nos ramos terminais da árvore. Fonte: o autor, 2023.

4.2 Anotação do pangenoma de *L. salivarius*

A anotação do pangenoma de referência revelou que a maioria dos genes encontrados estão associados a funções desconhecidas (S). Os outros COGs proeminentes são: replicação, recombinação e reparo (L); biogênese da parede celular/membrana/envelope (M); transcrição (K); mecanismos de defesa (V); transporte e metabolismo de carboidratos (G); e transporte e metabolismo de aminoácidos (E), dispostos em ordem decrescente de frequência, com todos apresentando representatividade maior que 5% entre todos os COGs encontrados. Em contraste, as categorias com frequências mais reduzidas são biossíntese de metabólitos secundários, transporte e catabolismo (Q), motilidade celular (N) e estruturas extracelulares (W), também dispostos em ordem decrescente e com representatividade menor que 1% entre todos os COGs (Figura 4A).

Por meio da análise dos genomas de *L. salivarius* obtidos, foram identificados 17 tipos de bacteriocinas sintetizadas por esse grupo, sendo distribuídos nas três classes utilizadas pelo sistema da ferramenta BAGEL4, sendo que, em apenas dois casos (menos de 1% dos genomas), não apresentaram predições para genes codificadores de bacteriocinas (Figura 4B). Assim, de uma forma geral, a presença de tais proteínas no grupo se mostra muito evidente, bem como diverso, haja vista que o conteúdo gênico para esses fatores encontra-se altamente variável, com uma média aproximada de 2,85 AOI por genoma. Esses achados são compatíveis com o conceito de genomas dinâmicos em relação ao conteúdo de bacteriocina.

Em relação às frequências obtidas, os genes referentes à proteína Enterolisina A - predita por meio do BAGEL4 em duas formas, a Enterolisina A I (ou 63.3 pelo seu ID no banco de dados da ferramenta, 343 aa) vinculada a espécie *Enterococcus faecalis* e a Enterolisina A II (64.3, 213 aa) encontrada em *Lactobacillus acidophilus*; representou, somando suas duas predições, 55,84% das regiões codificadoras de bacteriocinas para os genomas obtidos, em sequência, Salivaricina P (cadeia a), Salivaricina P (cadeia b) e Nisina F, encontraram-se também apresentando uma forte representatividade, estando presente em mais de 5% das AOI identificadas. Em contrapartida, Lactacina-F (lafX), Acidocina LF221B (Gassericina K7 B/9 Helveticina J, Estreptina e Sakacina

G skgA2, em ordem decrescente, foram as bacteriocinas com as frequências inferiores entre as encontradas, estando presente em menos de 1% dos genomas analisados.

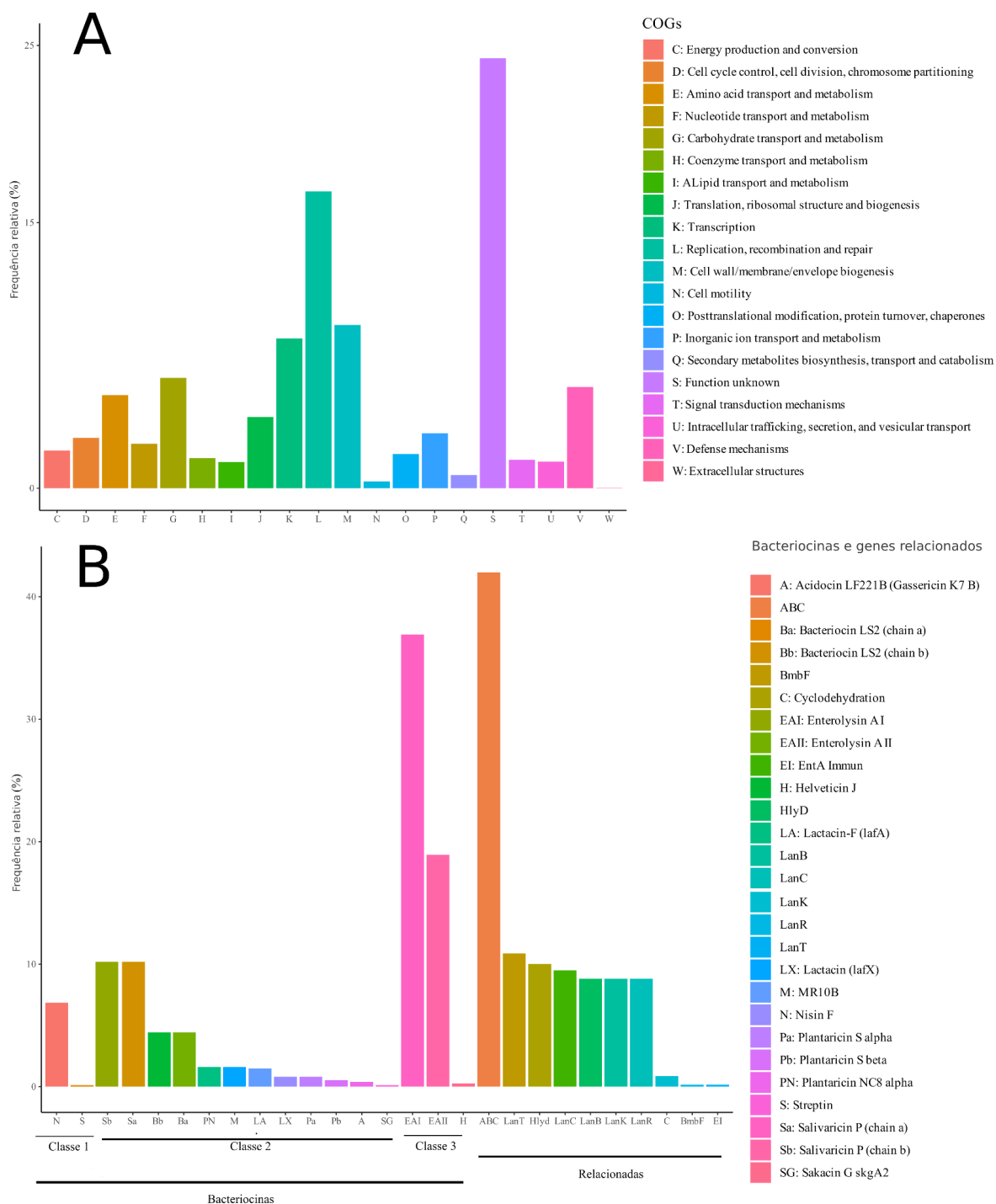


Figura 4. A. Gráfico das frequências apresentadas pelos agrupamentos de Genes Ortólogos (COG), obtidos pela anotação funcional do pangenoma de referência de *L. salivarius*. B. Gráfico das frequências dos genes codificadores de bacteriocina, bem como genes associados a essas proteínas, preditos através da anotação por meio da ferramenta BAGEL4 e curadoria manual. Fonte: o autor, 2023.

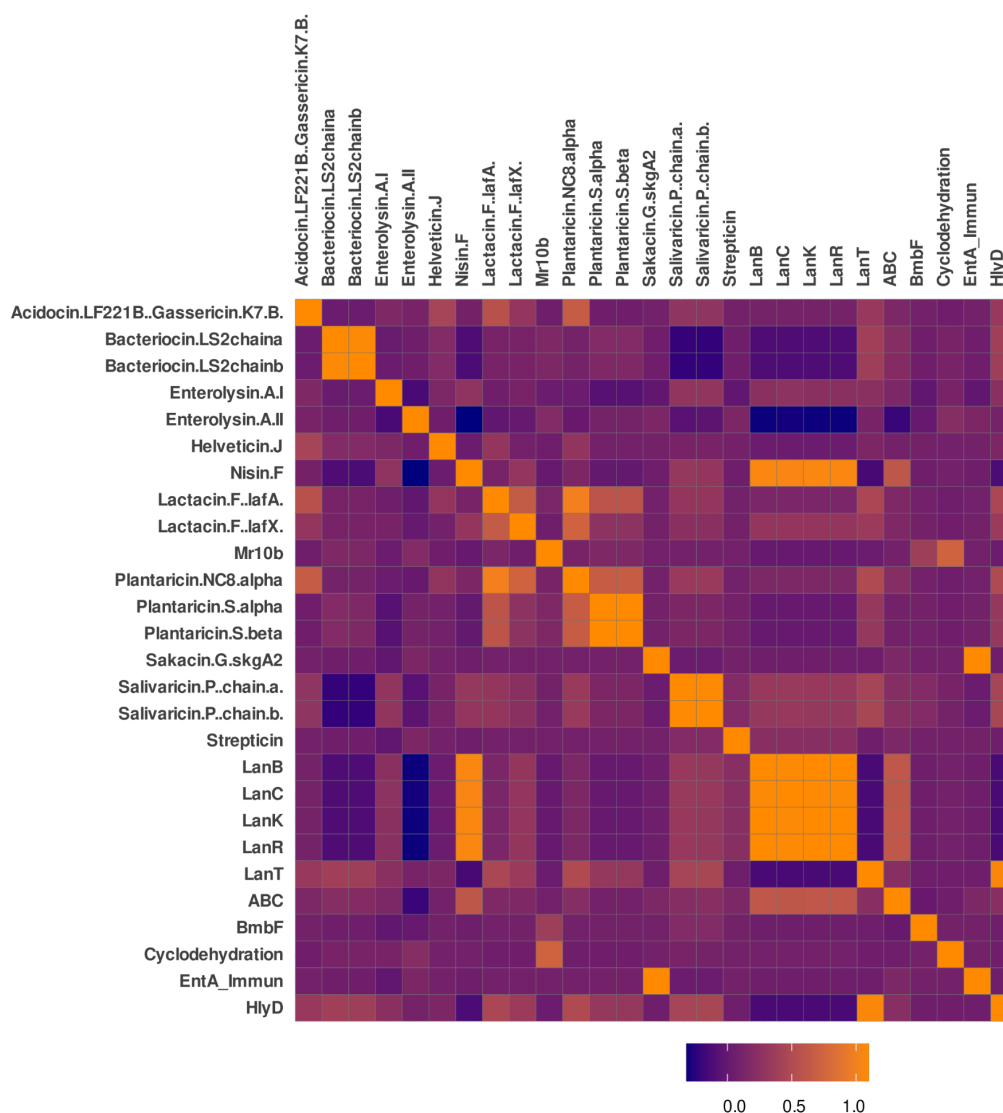


Figura 5. Heatmap dos coeficientes de correlações para presença e ausência dos genes codificadores de bacteriocinas e associados preditos nos isolados de *L. salivarius*. Fonte: o autor, 2023.

A análise de correlações permitiu identificar que existe uma maior correlação entre os genes LS2 cadeia alfa e LS2 cadeia beta, ocorrendo de forma conjunta de maneira significativa, bem como nos casos entre as bacteriocina plantaricina S alfa e beta e Salivaricina P cadeia alfa e beta (Figura 5).

O resultado em relação ao genes associados com as bacteriocinas indicaram uma correlação entre a presença conjunta entre os genes *LanB*, *LanC*, *LanK* e *LanR* - genes responsáveis pelas modificações e alterações pós-traducionais das bacteriocinas - estando intimamente ligados com a presença

da Nisina F, algo esperado por se tratar de uma bacteriocina de classe I que apresenta em sua dinâmica de formação modificações desse tipo.

A composição de aminoácidos, instabilidade e demais características físico-químicas das proteínas preditas foram obtidas pela ferramenta ProtParam e esquematizadas em uma tabela (Tabela 2).

Por meio delas pode ser calculado, levando em consideração a sequência de aminoácidos identificados e suas respectivas massas moleculares dos componentes da predição analisada, o peso molecular de sua estrutura - sendo medido em Dalton. Os resultados indicaram uma grande plasticidade e corroboração com a classificação desses peptídeos em relação a seu peso molecular, como podemos ver os representantes de classe 2 possuindo valores menores a 10 kDa e de classe 3 maiores que 10 kDa.

Em relação ao índice de instabilidade, que apresenta uma estimativa referente ao padrão de estabilidade manifestado pela estrutura predita - no qual valores menores que 40 indicam estabilidade da proteína e superiores a esse valor sugerem o oposto (Gasteiger *et al.*, 2005); apenas a sequência de nisina-F e plantaricina NC8 alfa demonstraram valores considerados instáveis (49,19 e 47,25, respectivamente), demonstrando uma característica esperada para esse grupo de proteínas.

Além disso, o índice alifático - sendo esse definido como determinante do volume relativo ocupado pelas cadeias laterais alifáticas, tais quais alanina, valina, isoleucina e leucina, onde valores mais elevados tendem a ser mais termoestáveis (Guruprasad *et al.*, 1990) apresentou outro resultado interessante. Segundo as estimativas com valores positivos encontrados, podemos notar que há termoestabilidade como característica entre as proteínas preditas.

Tabela 3. Características físico-químicas obtidas pelo ProtParam para as bacteriocinas previstas com base na sequência modelo usada para modelagem.

Fonte: o autor, 2023.

Bacteriocin	Amino acid residues	Molecular weight (Da)	Theoretical pI	Extinction Coefficient	Instability index	Aliphatic index	Grand Average of Hydropathicity
Acidocina LF221B (Gassericina K7 B)	32	3315,58	4,31	5.500	11,98	76,25	-0,350
Bacteriocina LS2 cadeia a	45	4185,82	9,31	1.490	17,00	69,56	0,560
Bacteriocina LS2 cadeia b	52	5269,01	10,33	11125	-1,17	65,96	0,16
Enterolisina A I	175,00	19181,13	6,02	28420	10,45	71,77	-0,406
Enterolisina A II	155,00	16911,82	5,79	25440	3,44	75,42	-0,221
Helveticina-J	292	32807,49	6,59	55350	22,83	77,53	-0,64
Nisina F	37	3805,55	9,01	1740	49,19	63,24	0,295
Lactacina-F (lafA)	53	4989,71	8,03	8605	20,79	77,55	0,664
Lactacina-F (lafX)	50	5355,98	4,64	6990	20,53	87,6	-0,03
Mr10b	34	3916,8	9,88	6990	25,79	97,65	0,132
Plantaricina NC8 alfa	33	4074,68	9,6	18450	47,25	62,12	-0,755
Plantaricina S alfa	29	3059,61	10,28	8400	14,76	121,38	0,638
Plantaricina S beta	24	2500,84	5,99	1490	8,7	109,58	0,562
Salivaricina P (cadeia a)	67	6537,81	6,01	125	18,46	101,94	0,797
Salivaricina P (cadeia b)	68	6721,58	8,8	12615	27,71	73,24	0,084
Streptina	46	5207,08	8,55	7115	30	82,61	-0,363
Sakacina G skgA2	41	4616,13	9,24	25105	22,73	45,12	-0,578

4.3 Alinhamento das predições

Com as bacteriocinas preditas, foi realizado um alinhamento pela ferramenta MAFFT, conferindo as divergência entre as sequências obtidas. Por meio da análise destes, percebemos que há uma conservação entre as predições para as distintas cepas de *L. salivarius*, como pode ser observado nos casos das bacteriocinas nisina F (Figura 6), Mr10b (Figura 7) e (LafA) (Figura 8) com destaque para este último exemplo onde notamos uma inserção de 3 e 10 aminoácidos nas cepas An84, T3, CCuG44481 e KZ-NCB. Em contrapartida, vemos em casos como da enterolisina A I (Figura 9), bacteriocina mais predita entre os demais grupos, um contexto mais diversificado em termos mutacionais entre as sequências encontradas.

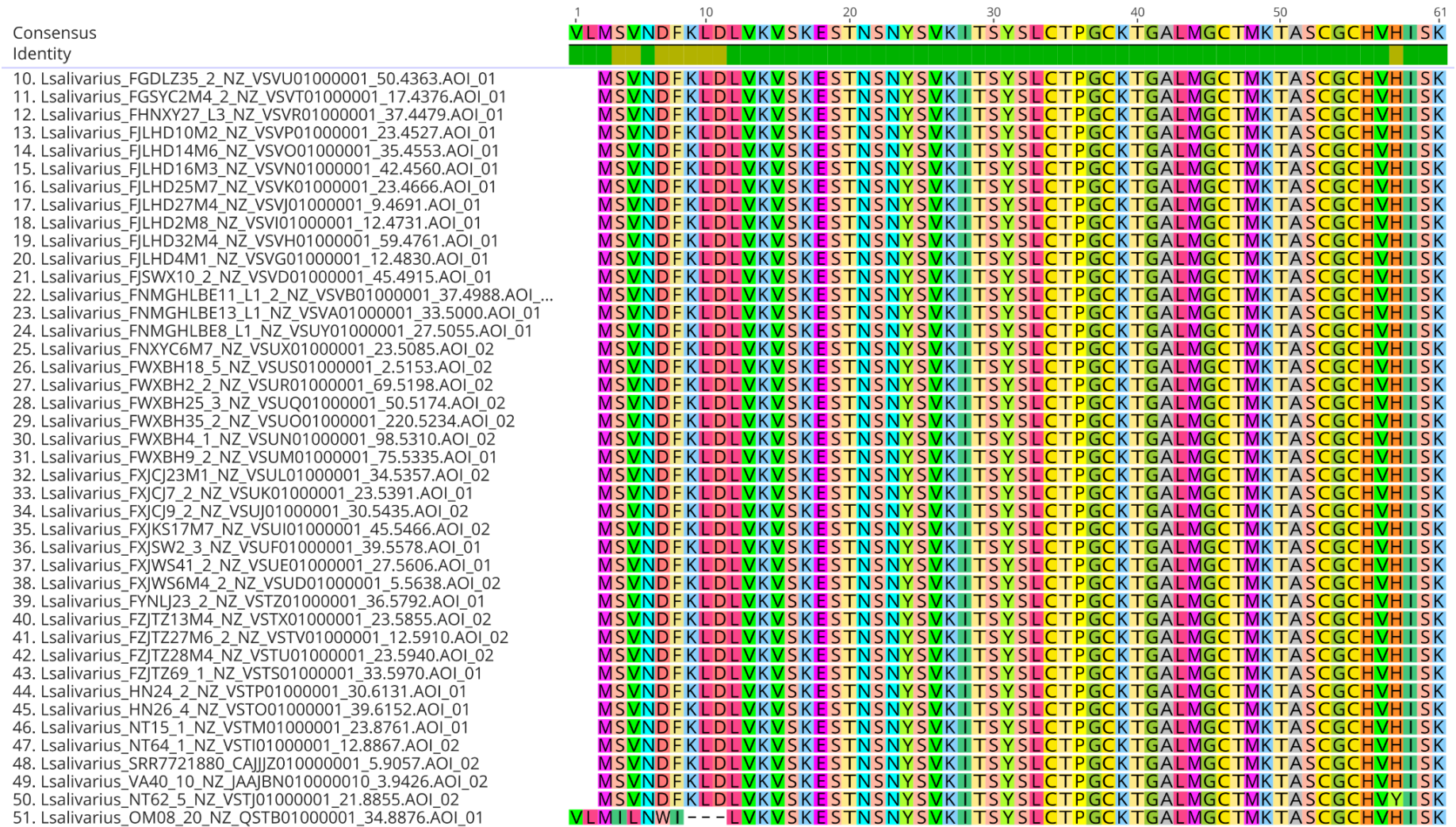


Figura 6. Alinhamento obtido para as sequências preditas de nisina F em *L. salivarius*. Fonte: o autor, 2023.

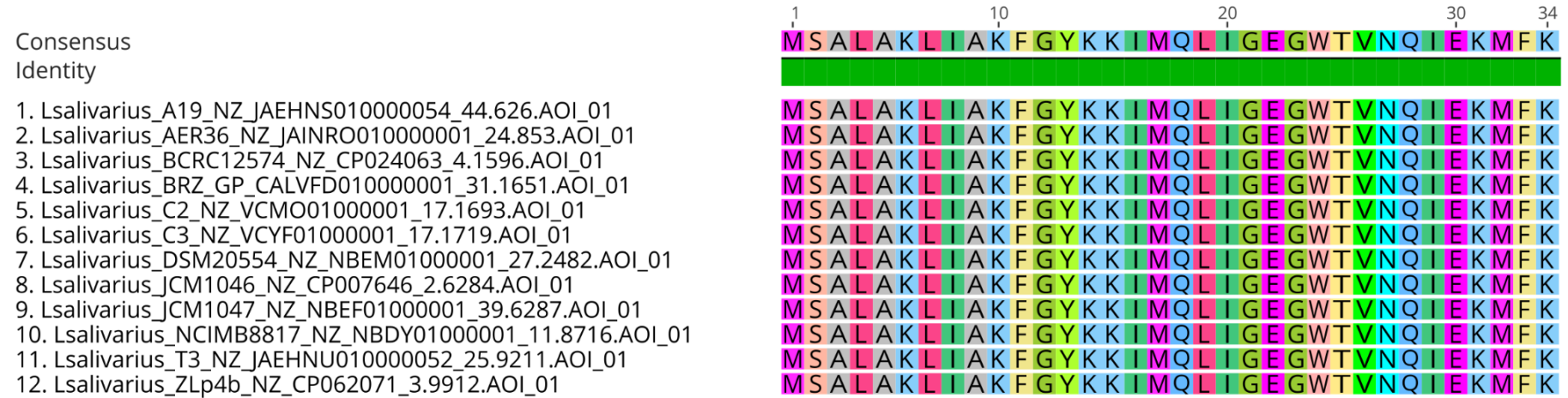


Figura 7. Alinhamento obtido para as sequências preditas de Mr10b em *L. salivarius*. Fonte: o autor, 2023.

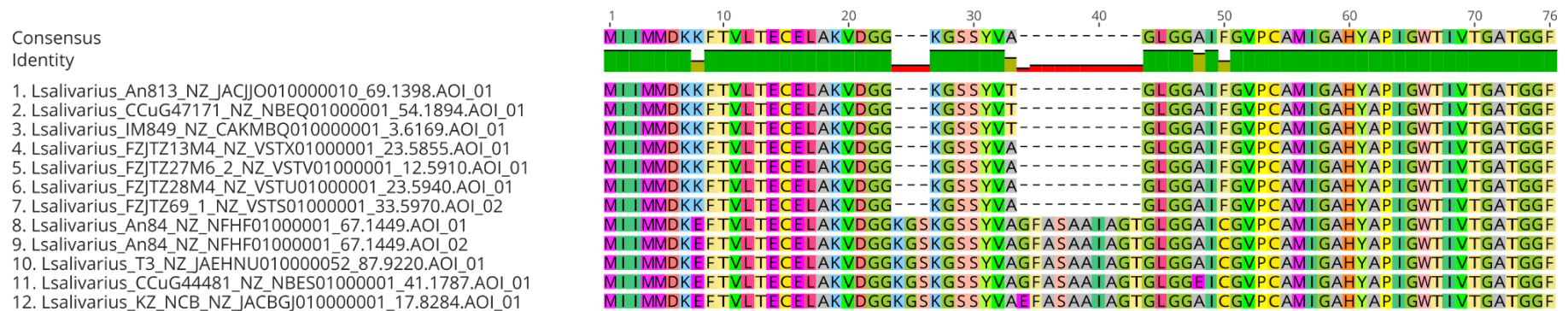


Figura 8. Alinhamento obtido para as sequências preditas de lactacina-F (lafA) em *L. salivarius*. Fonte: o autor, 2023.

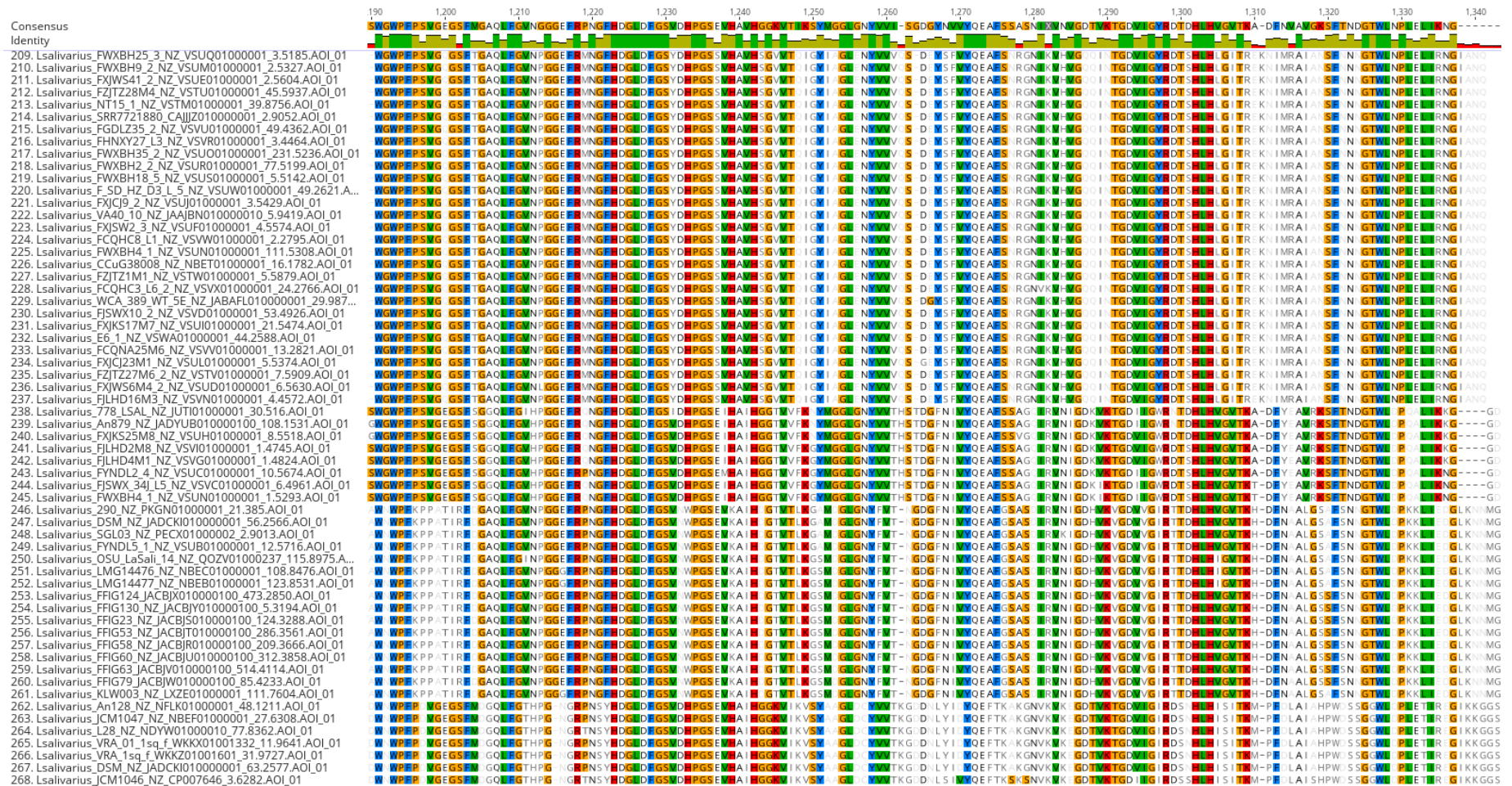


Figura 9. Parte do alinhamento e sequências previstas de enterolisina A I em *L. salivarius*. Fonte: o autor, 2023.

4.4 Modelagem molecular das bacteriocinas preditas para *L. salivarius*

Das 17 bacteriocinas, somente 11 apresentaram modelos similares armazenados no Banco de Dados de Proteínas, PDB (Berman *et al.*, 2000) (Tabela 3). Com exceção das bacteriocinas Enterolisina A I e II, além da Plantaricina S beta que apresentam sequências muito semelhantes aos modelos encontrados, as demais proteínas antimicrobianas, apesar de certa similaridade demonstrada, apresentam lacunas que as diferenciam estruturalmente, apesar de manterem regiões bem conservadas e compatíveis entre si. Essas diferenças puderam ser observadas não só em suas sequências, mas também na estrutura tridimensional predita por meio do AlphaFold e refinada pela ferramenta GalaxyRefine (Tabela 4).

Tabela 3. Melhores resultados do BLAST com seus respectivos melhores modelos de modelagem por homologia. Fonte: o autor, 2023.

Bacteriocin	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Enterolisina A I	283	88%	2,00E-98	87,01%	A0A7D7A9S9
Enterolisina A II	310	98%	1,00E-109	98,69%	A0A7D7A9S9
Helveticina-J	464	87%	9,00E-171	75,09%	P22294
Nisina F	60,5	100%	1,00E-20	75,68%	P29559
Mr10b	45,8	97%	2,00E-08	57,50%	Q1A2D2
Plantaricina S alfa	24,8	57%	6,00E-06	47,62%	O32831
Plantaricina S beta	40,5	56%	0,000	92,31%	O32830
Salivaricina P (cadeia a)	122	100%	3,00E-44	100%	Q1WQX7
Salivaricina P (cadeia b)	130	100%	2,00E-47	97,06%	Q1WQX8
Streptina	77,4	100%	6,00E-27	76,09%	P0C0H8
Sakacina G skgA2	28,5	44%	8,00E-08	57,89%	P35618

Tabela 4. Dados referentes aos melhores modelos de predição obtidos por meio do AlphaFold2 e refinados pelo GalaxyRefine. Fonte: o autor, 2023.

Bacteriocin	GDT-HA	RMSD	MolProbity	Clash score	Poor rotamers	Rama favored
Acidocina LF221B (Gassericina K7 B)	0,906	0,575	1,216	4,4	0	100
Bacteriocina LS2 cadeia a	0,944	0,481	1,271	5,1	0	100
Bacteriocina LS2 cadeia b	0,9567	0,44	1,182	4	0	100
Enterolisina A I	0,998	0,252	1,474	8,9	0,7	98,8
Enterolisina A II	0,995	0,271	1,49	9,2	0,8	98,7
Helveticina-J	0,99	0,275	1,626	13,1	0	98,6
Nisina F	0,9189	0,581	1,309	5,7	0	100
Lactacina-F (lafA)	0,9906	0,271	1,911	10,1	3,2	100
Lactacina-F (lafX)	0,895	0,629	0,788	0	0	95,8
Mr10b	0,992	0,223	0,926	1,7	0	100
Plantaricina NC8 alfa	0,9318	0,53	0,5	0	0	100
Plantaricina S alfa	0,9914	0,237	0,748	0	0	95,5
Plantaricina S beta	0,9792	0,297	1,074	2,9	0	100
Salivaricina P (cadeia a)	0,955	0,421	1,286	5,3	0	100
Salivaricina P (cadeia b)	0,911	0,69	2,09	9,5	2,3	95,5
Streptina	0,831	0,8	1,553	2,7	4,5	100
Sakacina G skgA2	0,9643	0,403	0,866	0	3	100

Bacteriocins predicted for *Ligilactobacillus salivarius*

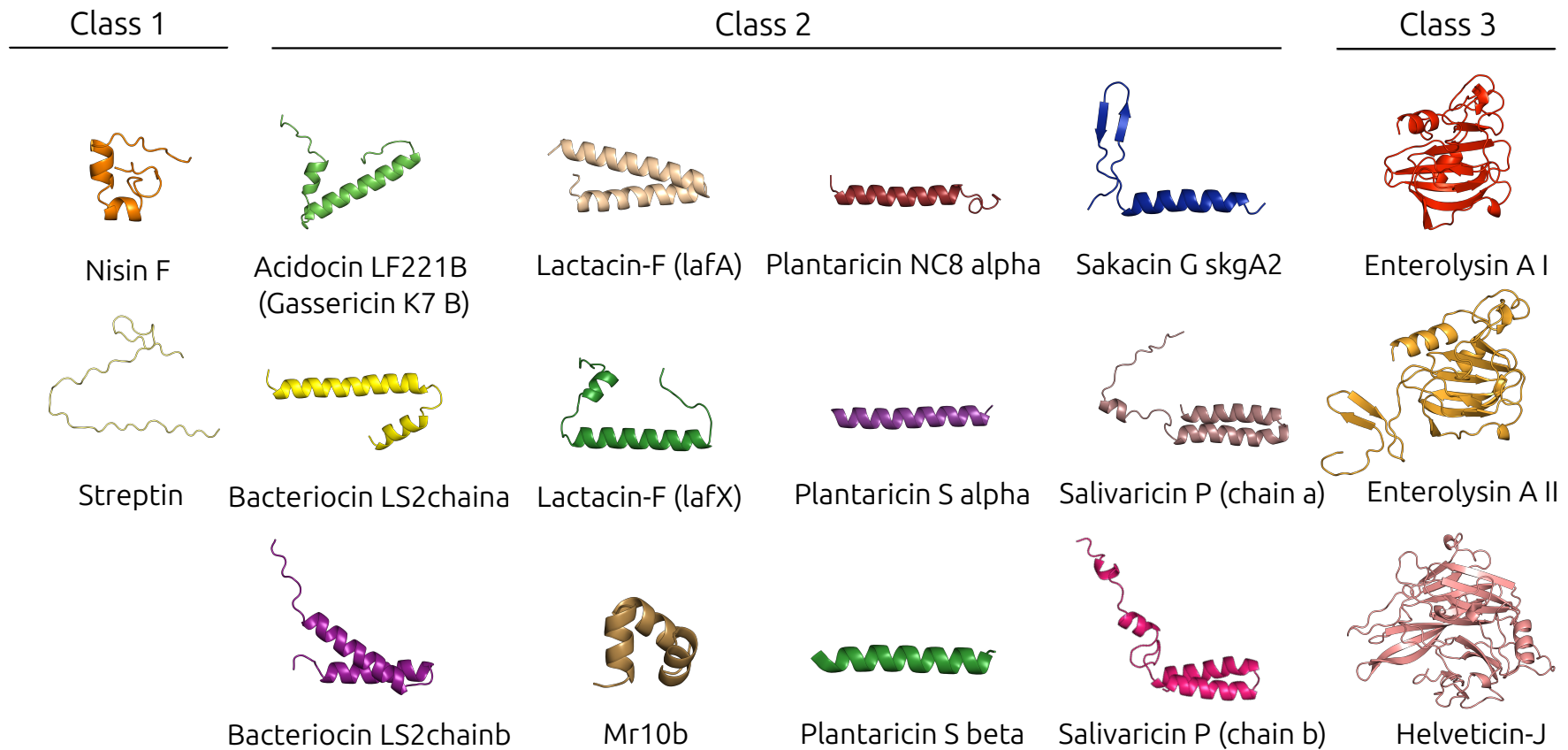


Figura 10. Modelos gerados para as bacteriocinas preditas para *L. salivarius*. Fonte: o autor, 2023.

Comparison between the protein structure obtained by AlphaFold and PDB

■ incompatibility or gap in relation to the model sequence

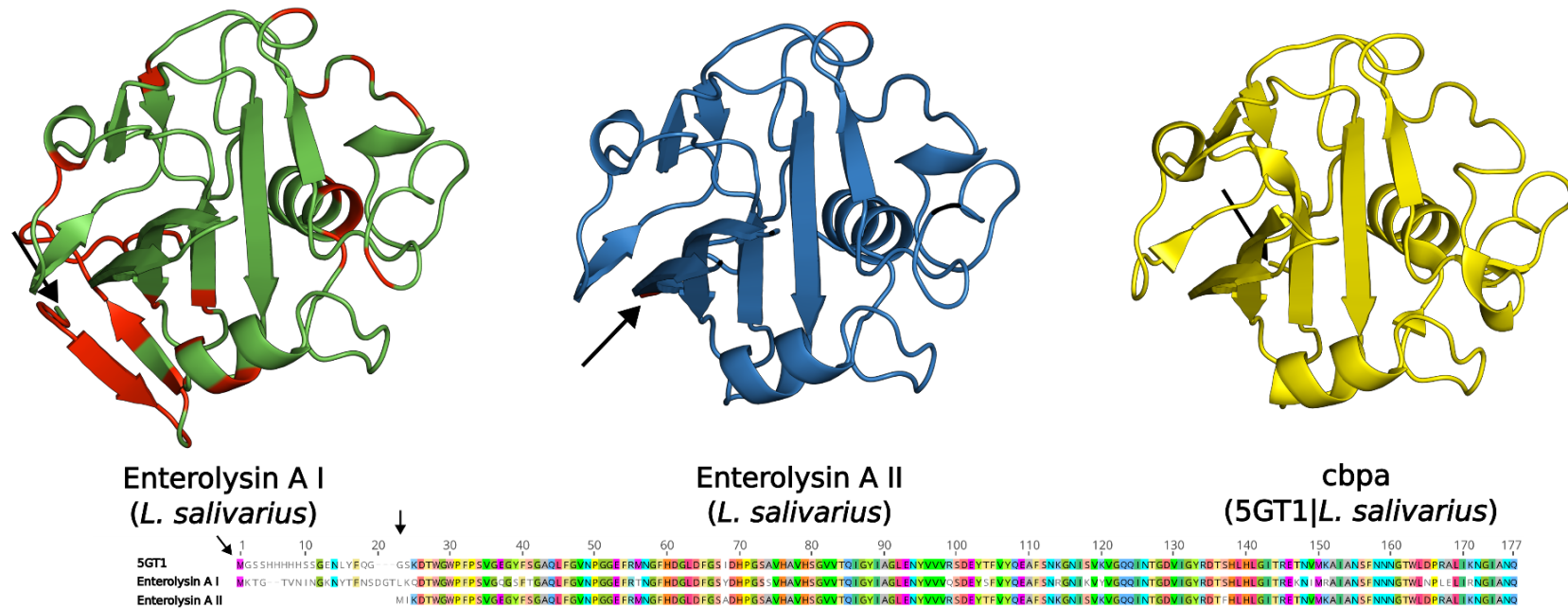


Figura 11. Modelagem molecular das bacteriocinas Enterolisina A I e Enterolisina A II com base na sequência modelo comparadas ao melhor modelo encontrado pelo BLAST. Fonte: o autor, 2023.

Comparison between the protein structure obtained by AlphaFold and PDB

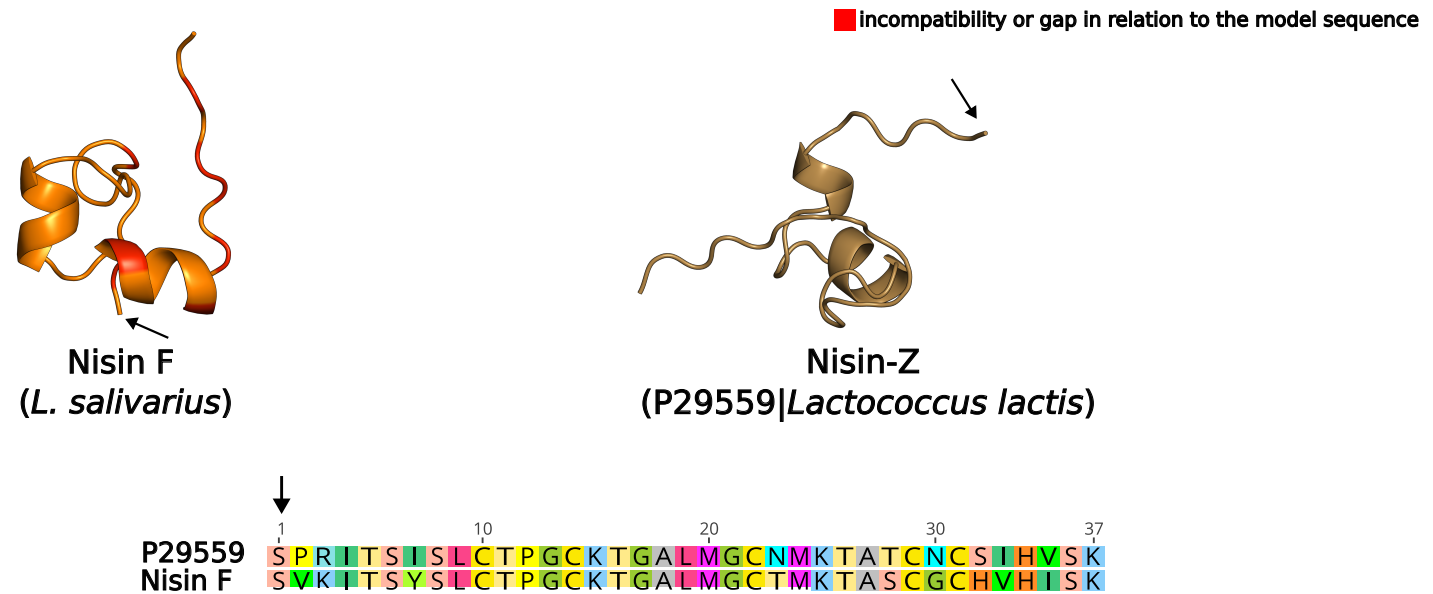


Figura 12. Modelagem molecular da bacteriocina Nisina F com base na sequência modelo comparadas ao melhor modelo encontrado pelo BLAST. Fonte: o autor, 2023.

Comparison between the protein structure obtained by AlphaFold and PDB

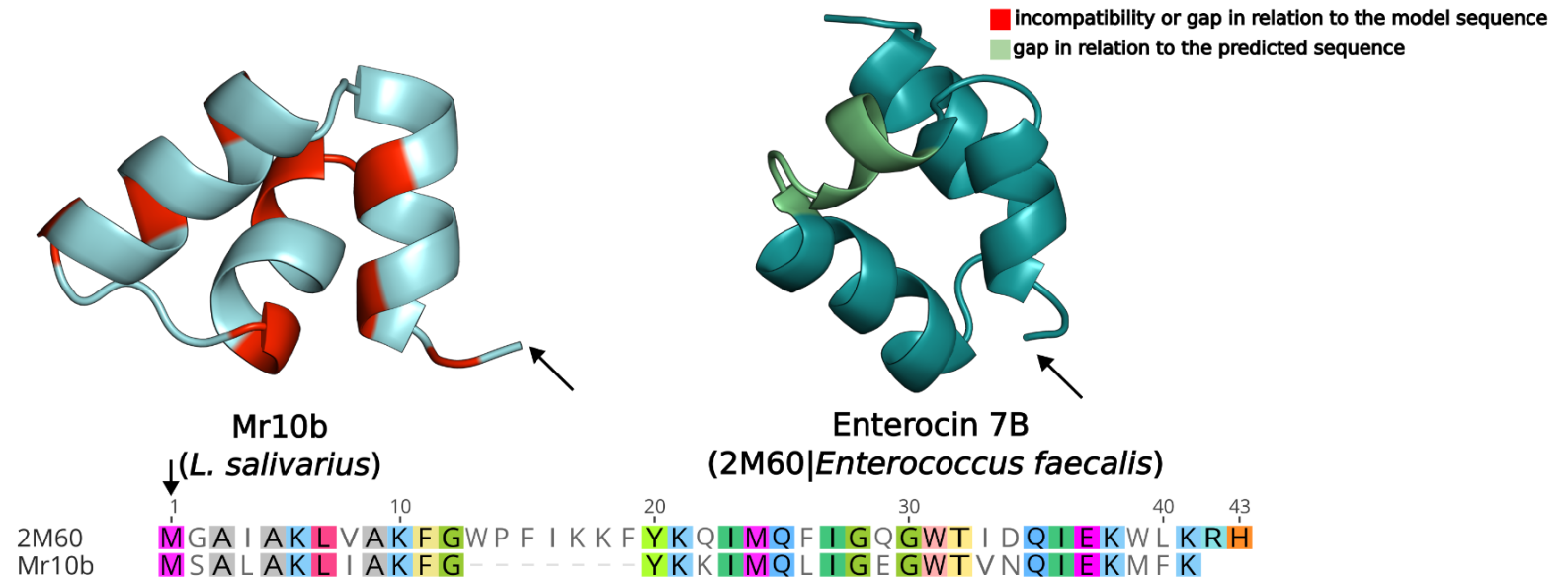


Figura 13. Modelagem molecular da bacteriocina Mr10b com base na sequência modelo comparadas ao melhor modelo encontrado pelo BLAST. Fonte: o autor, 2023.

Comparison between the protein structure obtained by AlphaFold and PDB

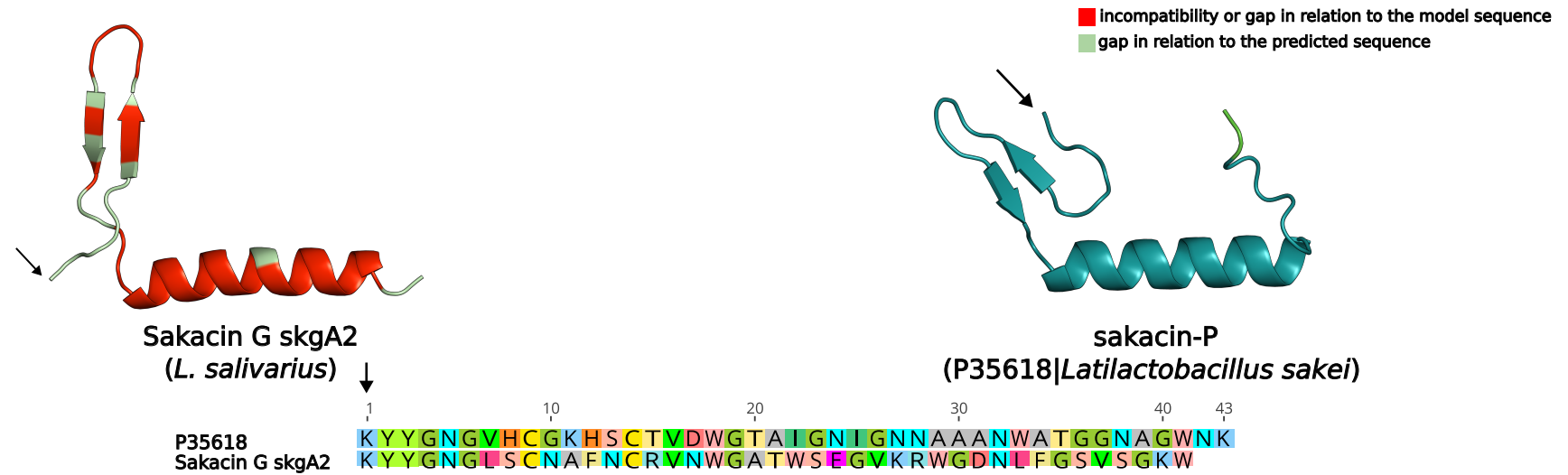


Figura 14. Modelagem molecular da bacteriocina Plantaricina S alfa com base na sequência modelo comparadas ao melhor modelo encontrado pelo BLAST. Fonte: o autor, 2023.

Comparison between the protein structure obtained by AlphaFold and PDB

■ Incompatibility or gap in relation to the model sequence

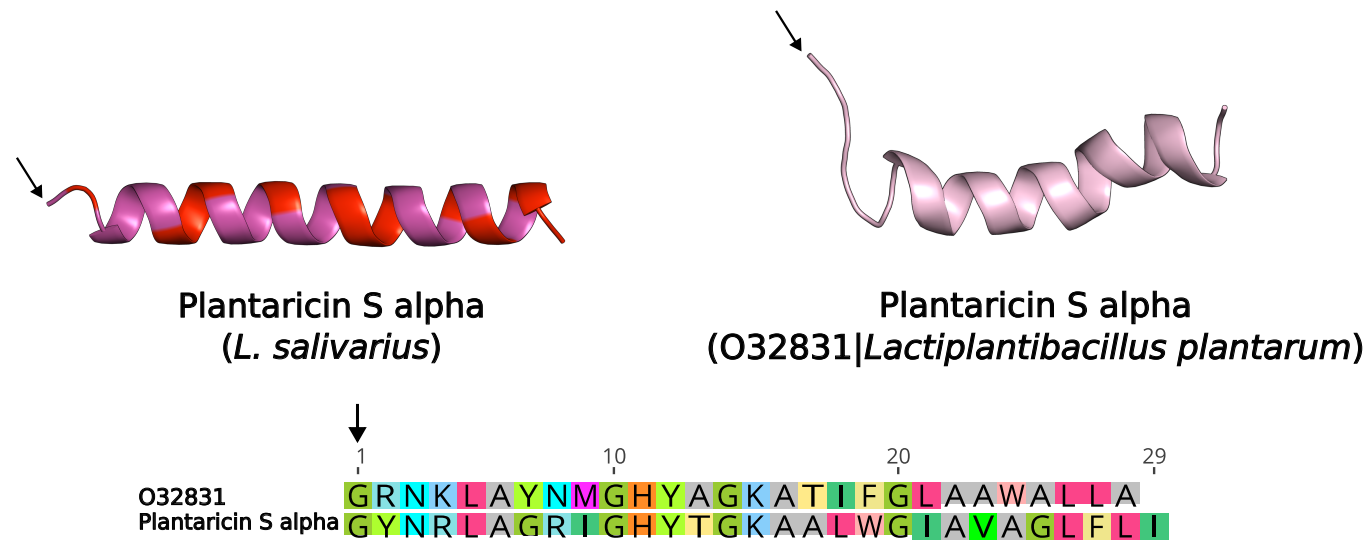


Figura 15. Modelagem molecular da bacteriocina Plantaricina S alfa com base na sequência modelo comparadas ao melhor modelo encontrado pelo BLAST. Fonte: o autor, 2023.

Comparison between the protein structure obtained by AlphaFold and PDB

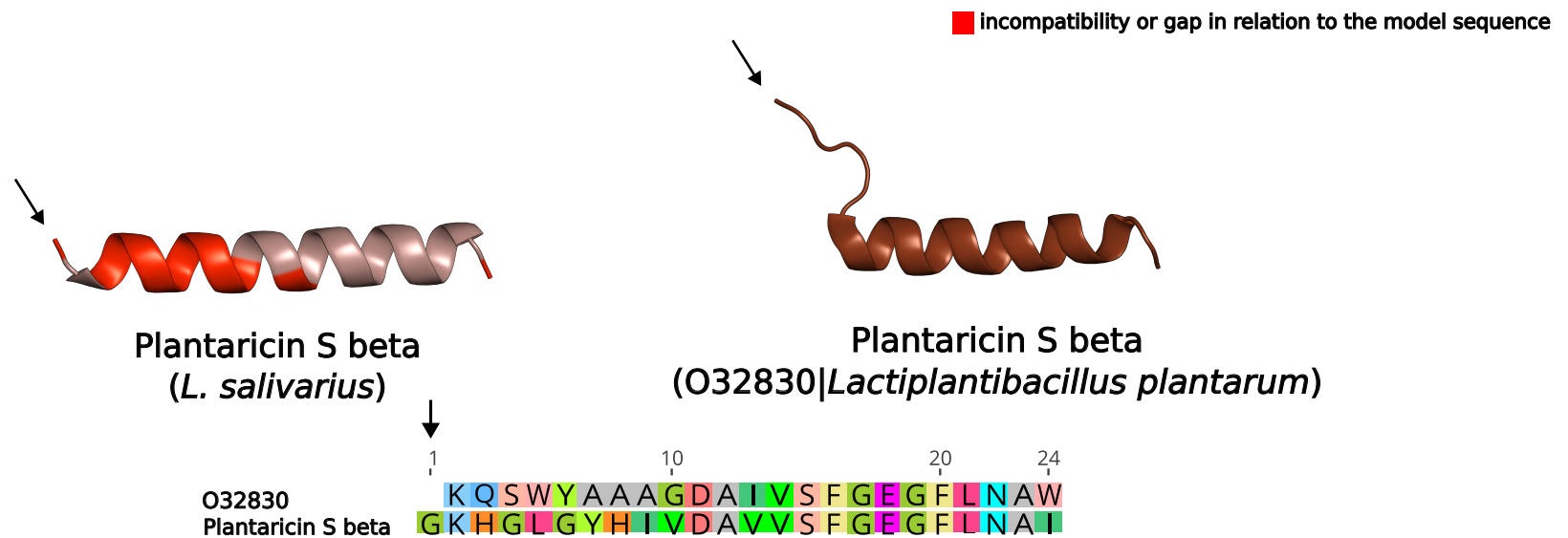


Figura 16. Modelagem molecular da bacteriocina Plantaricina S beta com base na sequência modelo comparadas ao melhor modelo encontrado pelo BLAST. Fonte: o autor, 2023.

Comparison between the protein structure obtained by AlphaFold and PDB

■ incompatibility or gap in relation to the model sequence

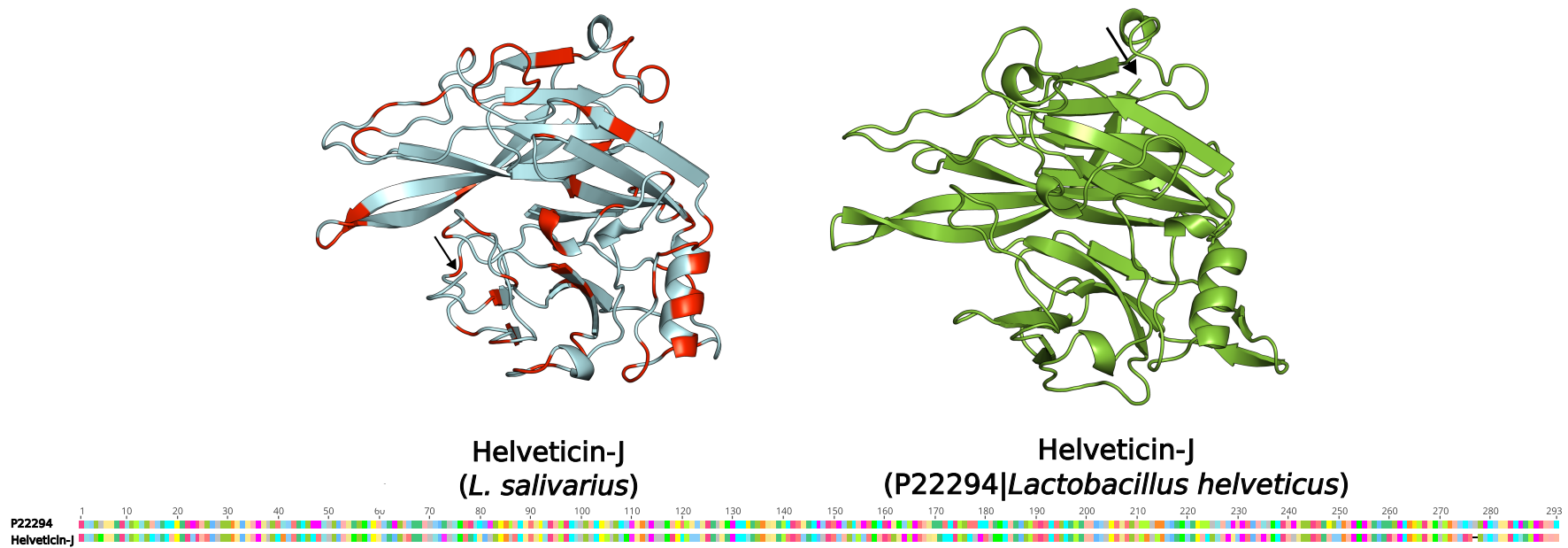


Figura 17. Modelagem molecular da bacteriocina Helveticina-J com base na sequência modelo comparada ao melhor modelo encontrado pelo BLAST.
Fonte: o autor, 2023.

Comparison between the protein structure obtained by AlphaFold and PDB

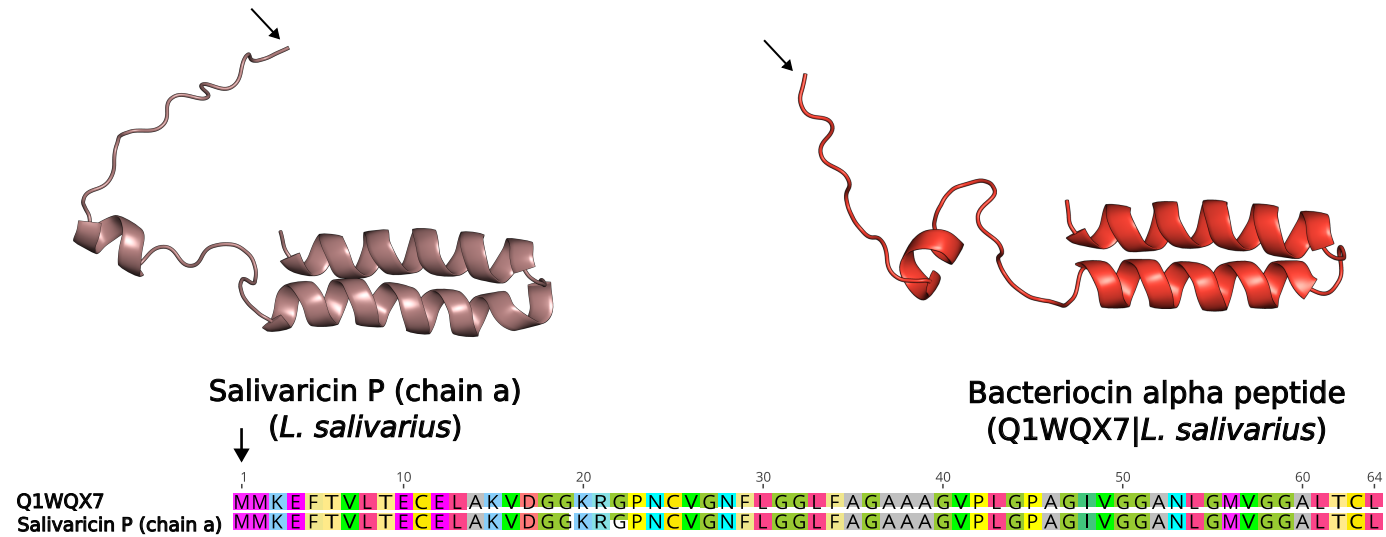


Figura 18. Modelagem molecular da bacteriocina Salivaricin P (cadeia a) com base na sequência modelo comparada ao melhor modelo encontrado pelo BLAST. Fonte: o autor, 2023.

Comparison between the protein structure obtained by AlphaFold and PDB

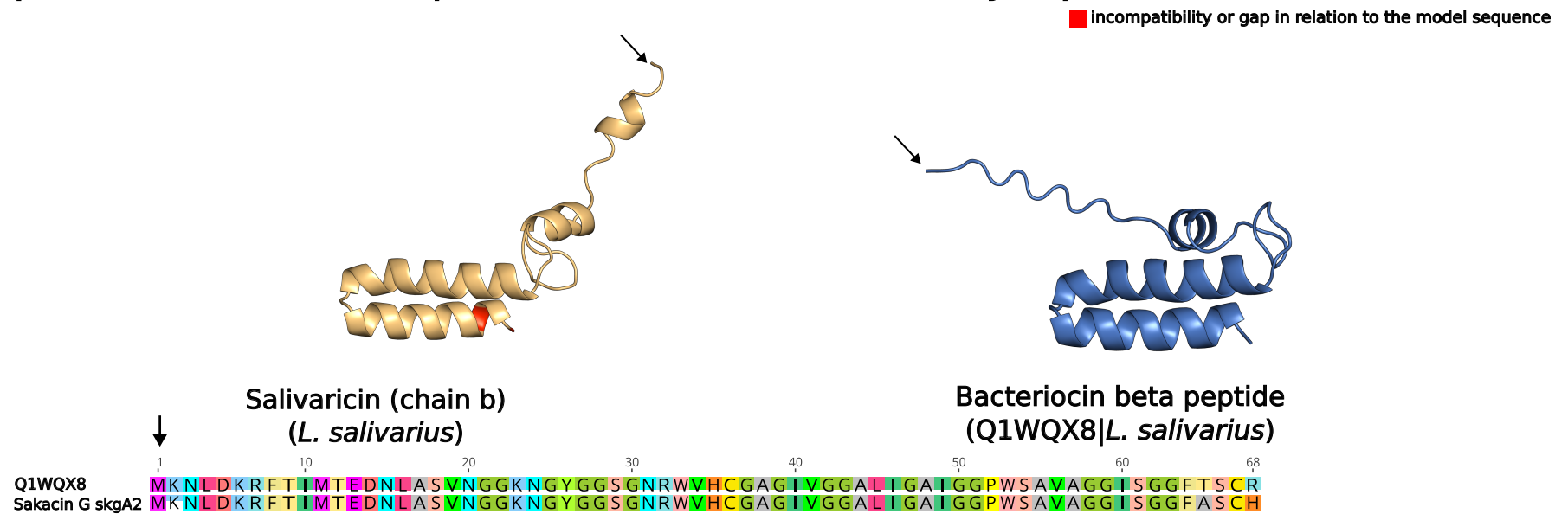


Figura 19. Modelagem molecular da bacteriocina Salivaricina P (cadeia b) com base na sequência modelo comparada ao melhor modelo encontrado pelo BLAST. Fonte: o autor, 2023.

Comparison between the protein structure obtained by AlphaFold and PDB

■ Incompatibility or gap in relation to the model sequence

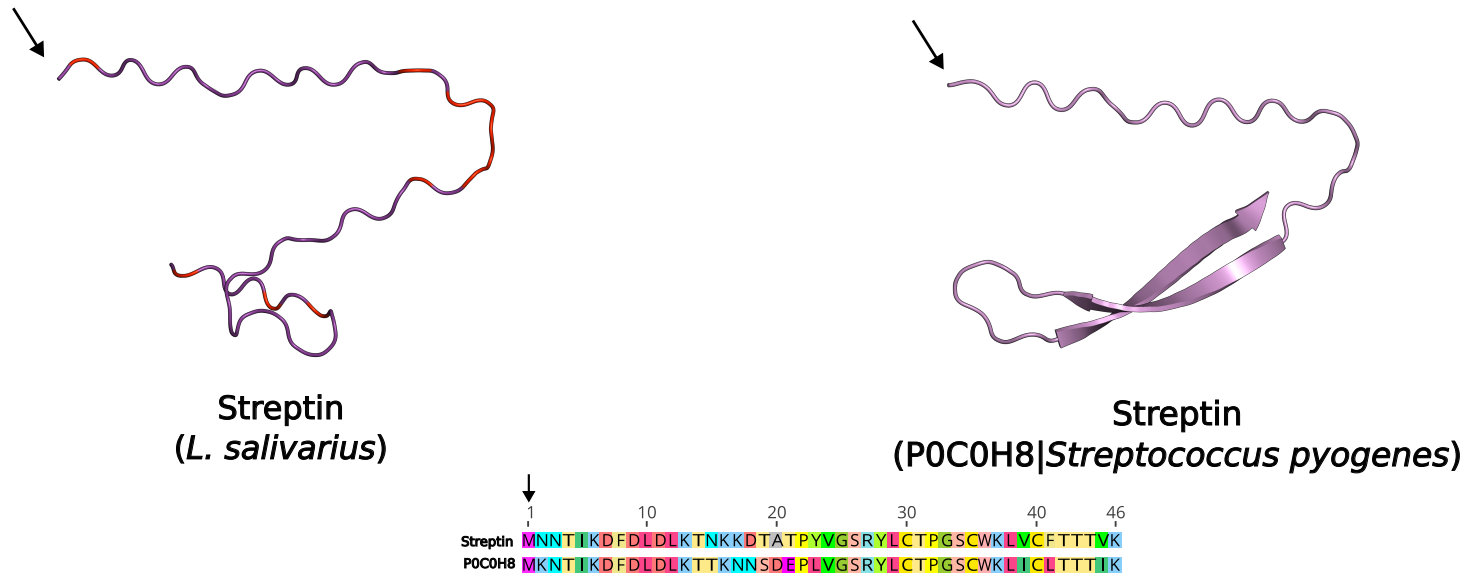


Figura 20. Modelagem molecular da bacteriocina Estreptina com base na sequência modelo comparada ao melhor modelo encontrado pelo BLAST. Fonte: o autor, 2023.

4.5 Análise comparativa filogenômica

Por meio da análise filogenômica a partir dos genes compartilhados entre todos os genomas de *L. salivarius* obtidos, foi possível a constatação da não existência de uma correlação evidente entre o perfil genético relacionado à presença das bacteriocinas e as respectivas fontes de isolamento - origem espacial e tecido ao qual foi isolado; corroborando para a hipótese da ocorrência de um mecanismo dinâmico de aquisição e perda de bacteriocinas de forma independente das forças evolutivas associadas a cada fonte de isolamento (Figura 21).

Isolation Sources

- Others
- Fecal matter mammals
- Fecal matter birds
- Gastrointestinal tract birds
- Gastrointestinal tract mammals

Bacteriocin and related

- Streptin
- Salivaricin P (chain b)
- Salivaricin P (chain a)
- Sakacin G skgA2
- Plantaricin S beta
- Plantaricin S alpha
- Plantaricin NC8 alpha
- Mr10b
- Lactacin-F (lafX)
- Lactacin-F (lafA)
- Nisin F
- Helveticin-J
- Enterolysin A II
- Enterolysin A I
- Bacteriocin LS2chainb
- Bacteriocin LS2chaina
- Acidocin LF221B (Gassericin K7 B)
- HlyD
- EntA Immun
- Cyclodehydration
- BmbF
- ABC
- LanT
- LanR
- LanK
- LanC
- LanB

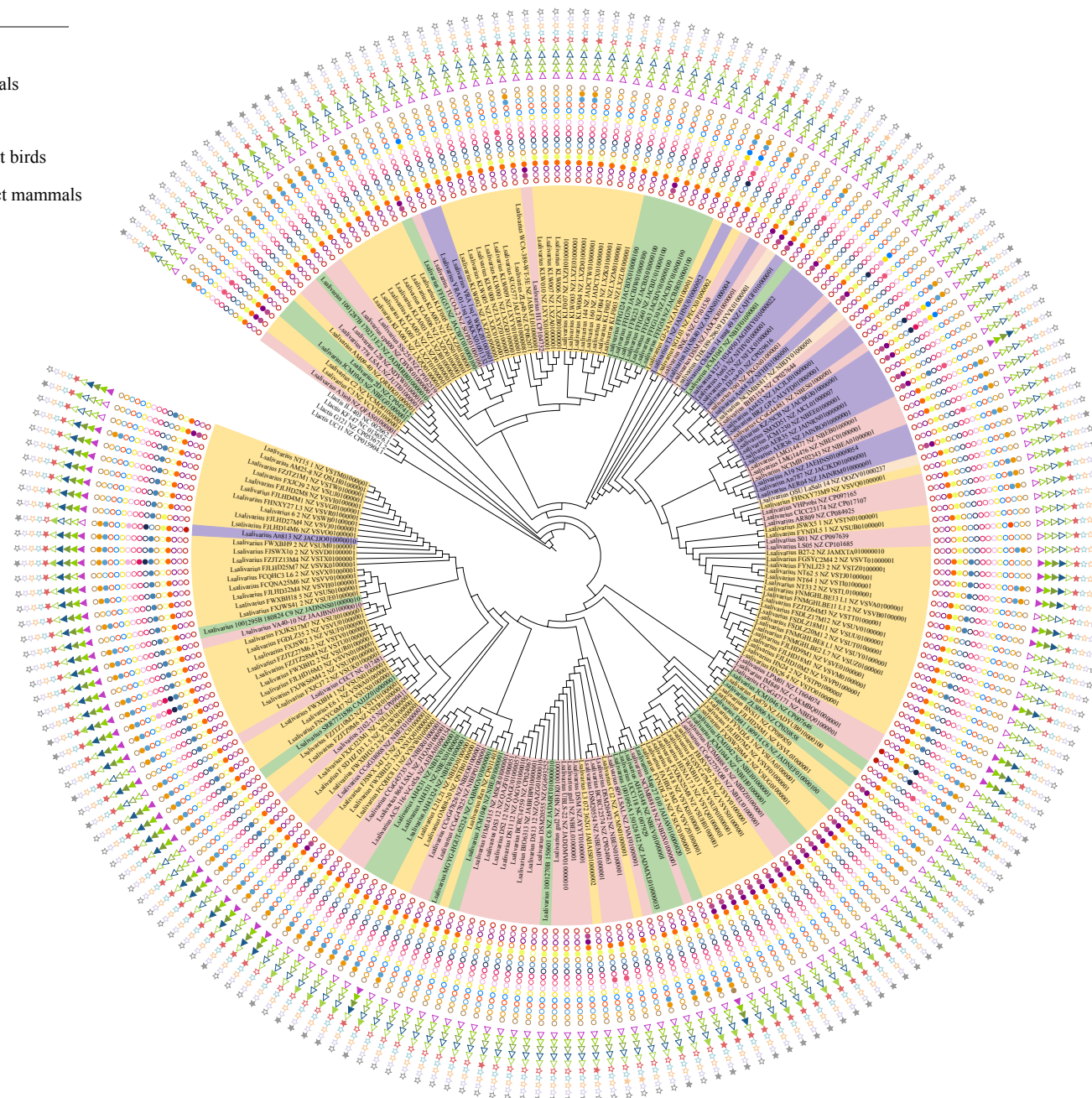


Figura 21. Representação filogenômica dos genomas de *L. salivarius* obtidos, sendo associado a informações de isolamento e genes relacionados. Os genomas de *L. lactis* G121, UC11, II1403 e KF147 foram usados como grupo externo. Fonte: o autor, 2023.

4.6 Genômica Comparativa das bacteriocinas preditas para *L. salivarius*

De acordo com a análise comparativa da localização dos loci responsáveis pela síntese das bacteriocinas preditas para *L. salivarius* nas áreas de interesse identificadas, podemos perceber que há padrões distintos entre os diferentes grupos de bacteriocinas, bem como notam-se distinções entre as AOIs de um mesmo grupo, ou seja, apesar de existir uma certa sintonia conservada entre as AOIs, ocorrem diferenças pontuais específicas da área de interesse. Em contrapartida, em alguns casos encontramos uma similaridade quase total entre as sequências clusterizadas, isso pode ser visto, por exemplo, a acidocina LF221B (Figura 22) apresenta uma identidade muito expressiva, o que pode ser um reflexo da baixa recorrência de predição da mesma perante todos genomas estudados - em apenas três situações; gerando um viés em sua investigação.

Somado a isso, percebe-se a presença conjunta nesse caso de outras bacteriocinas estando em uma mesma área de interesse ou no mesmo genoma, indicando que uma única cepa pode ser capaz de produzir mais de um tipo de bacteriocina, como por exemplo na cepa CCuG47171 contamos com a coexistência de genes ligados tanto a acidocina LF221B, quanto a lactacina-F (lafA), plantaricina NC8 alfa e salivaricina P em uma mesma AOI, além da presença de enterolisina A I, porém nesse caso em outra AOI. No caso da acidocina LF221B (Figura 22), verifica-se a presença mútua de lactacina F subunidade lafA, plantaricina NC8 e salivaricina P na mesma AOI, esse cenário é frequentemente visualizado nos demais grupos. Bem como a ausência de transposição ou genes de manutenção de plasmídeos identificados.

Analisando o contexto genômico, percebe-se um cenário bem conservado, contando com a presença da proteína BfmA de mobilização da família BtgA (Sitailo *et al.*, 1998) e Tirosina recombinase XerC (Smyshlyaev; Bateman; Barabas, 2021) em todas as AOIs poderia indicar que a localização da bacteriocina ocorre em uma posição vinculada a conjugação plasmidial, contudo nenhum desses genomas foi caracterizado com sequências plasmidiais depositadas. Ademais, notamos a presença dos genes de imunidade configurados pela síntese da proteína de imunidade putativa (Dayem *et al.*, 1996).

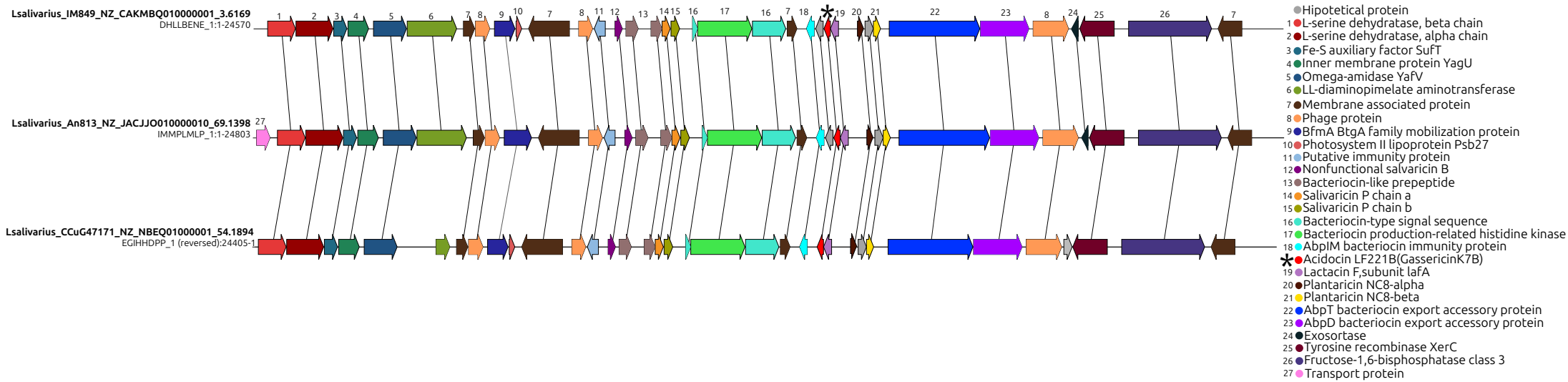


Figura 22. Sintenia das AOIs de acitocina LF221B identificadas nos genomas de *L. salivarius*.

Em relação a bacteriocina LS2 (Figura 23), verifica-se a ocorrência conjunta com lactacina F subunidade *lafA*, plantaricina NC8 e plantaricina S em alguns casos como nas cepas KZ-NCB e An84. Sua composição genômica pode ser descrita pela presença de dois genes codificantes de estruturas de imunidade, a proteína de imunidade putativa e Proteína de imunidade de bacteriocina AbpIM (Corr *et al.*, 2007) e dois genes de transposição, transposase da família IS200/IS605 ISLjo5 presente como na cepa ZLS006, AER35 e AER04 e transposase da família IS1223 na cepa AM25 8.

A presença de genes de transposases ou outros elementos genéticos móveis, como também genes de manutenção de plasmídeos, auxiliam como indicativo de que estas bacteriocinas estejam localizadas em um contexto plasmidial, sendo reforçada pela presença da cepa H1 que foi depositada junto com sequências plasmidiais caracterizadas.



Figura 23. Sintenia das AOIs de bacteriocina LS2 identificadas nos genomas de *L. salivarius*. Para melhor representação, algumas sequências que compartilham > 95% de identidade e > 95% da cobertura da AOI não foram mostradas.

Para enterolisina A, o BAGEL4 realizou a predição de duas variações para tal bacteriocina que foram, durante a análise, denominadas como enterolisina A I e II. Em ambos os casos, as duas formas da bacteriocina podem ser encontradas presentes simultaneamente no mesmo genoma, não ocorrendo em todas as situações.

Em destaque para o grupo I (Figura 24) essa predição, está indicada a presença de proteínas de origem viral ao redor da bacteriocina visualizada podendo se aludir a sua formação, inserção ou mobilidade do gene para a espécie em questão por meio da ação do ciclo lisogênico de bacteriófagos. Não fora predito nenhum gene ligado diretamente com o sistema imune nessas AOIs, contudo, os genomas identificados também contiveram AOIs diferentes na qual a predição indicou a síntese de outras bacteriocinas das quais genes de imunidade estavam presentes, sendo indícios, possivelmente, da existência de genes de imunidade localizados em posições mais distantes das áreas de interesse produtoras da enterolisina A, havendo somente o gene da Putative O-antigen transporter com sua localização próxima.

Já para o grupo II (Figura 25), encontramos predições, dessa vez, de um gene que confere resistência a cepa contra a ação de peptídeos antimicrobianos catiônicos, como o caso das bacteriocinas - Undecaprenyl-phosphate 4-deoxy-4-formamido-L-arabinose transferase; bem como Transportador de antígeno O putativo. Além disso, genes de mobilidade - transpostase IS1070 família IS30 (FNMGHLBE13, FJLHD10M2 e AH4331), Tyrosine recombinase XerC, transposase ISDge19 família IS200/IS605 (IBB3154) e transposase ISSth1 família ISL3 (IBB3154 e ZLp4b); foram identificados nas cepas analisadas, além de genomas com sequências plasmidiais como presente no seu grupo irmão.

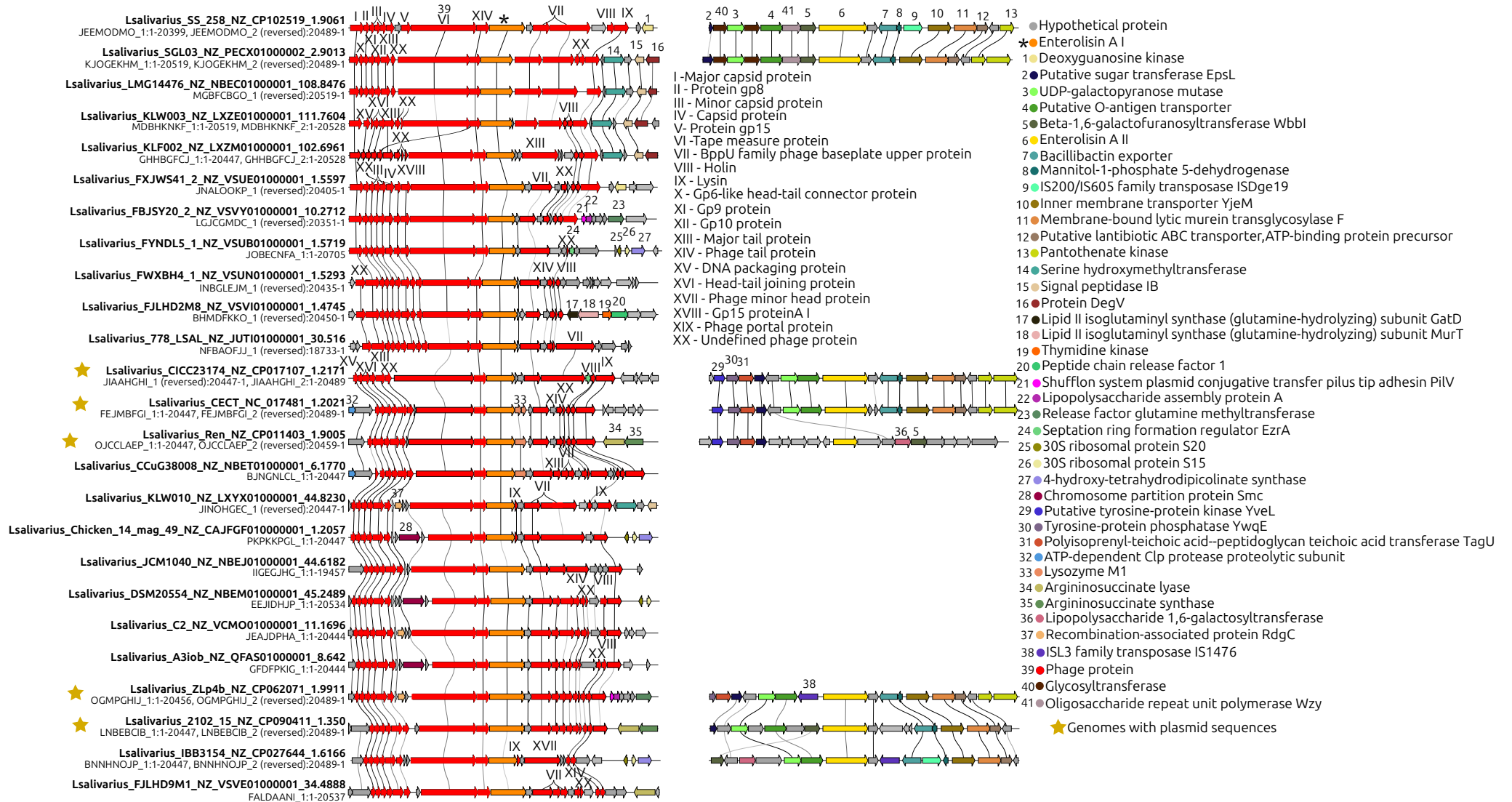


Figura 24. Sintenia das AOIs de enterolisina A, grupo I, identificadas nos genomas de *L. salivarius*. Para melhor representação, algumas sequências que compartilham > 95% de identidade e > 95% da cobertura da AOI não foram mostradas.

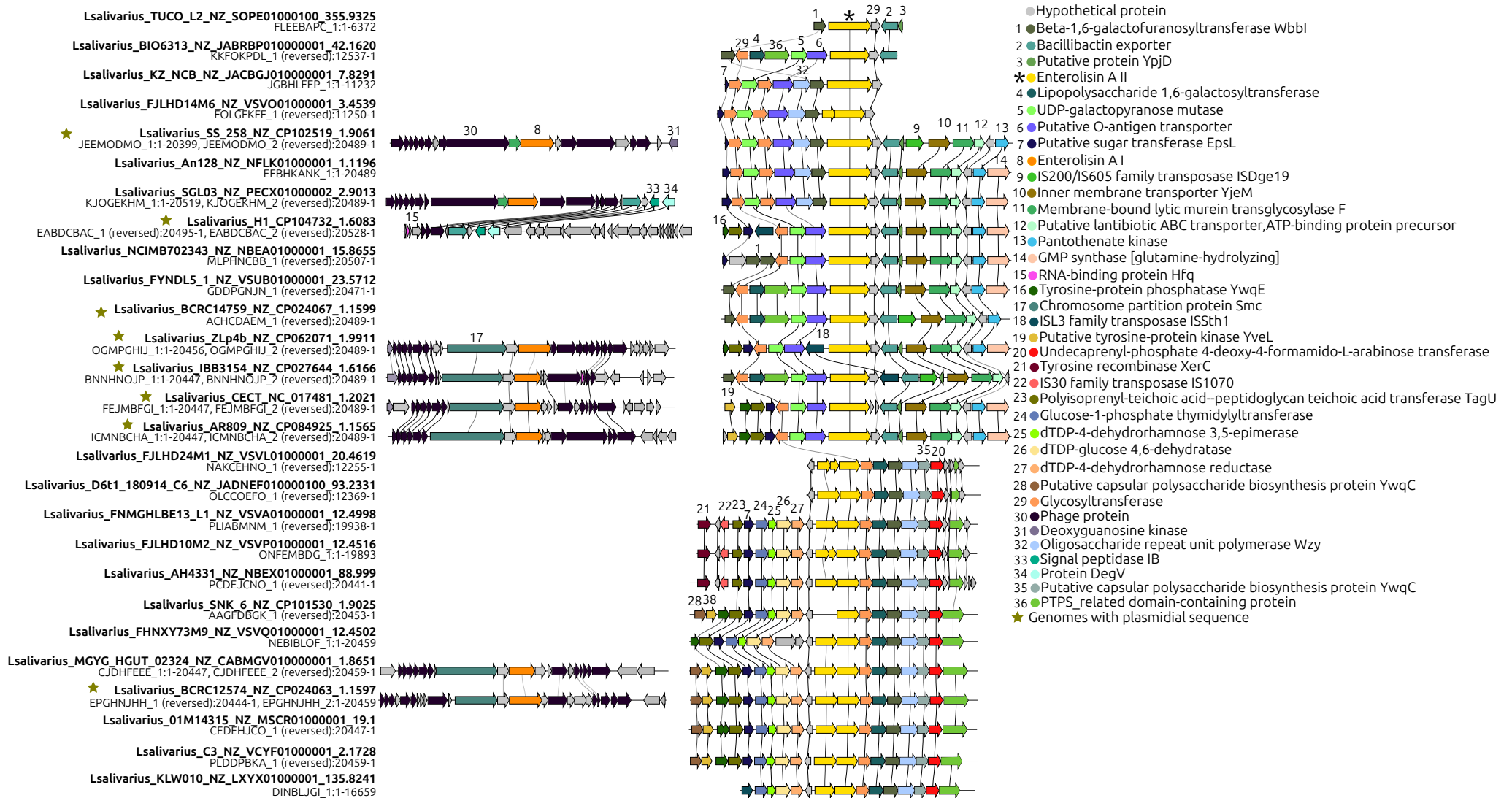


Figura 25. Sintenia das AOIs de enterolisina A, grupo II, identificadas nos genomas de *L. salivarius*. Para melhor representação, algumas sequências que compartilham > 95% de identidade e > 95% da cobertura da AOI não foram mostradas.

Na observação das áreas de interesse codificantes de nisina F (Figura 26), encontramos genomas que apresentam conjuntamente genes ligados a síntese de salivaricina P, lactacina F e plantaricina NC8 - essa última somente em um caso. Nota-se a correlação evidente entre a presença desta bacteriocina de classe I com genes que são envolvidos na modificação lantibiótica (*lanB* e *lanC*), regulação (*lanR* e *lanK*), exportação (*lanT*) e imunidade (*NisF*, *NisG* e *NisE*) estando todos organizados em clusters gênicos próximos. Ademais, a expressiva presença do gene sintetizante do transportador ABC em grande parte das AOI que sintetizam a nisina F.

A diversidade do contexto genômico é ainda mais evidente quando analisado que além da presença dos genes de imunidade ligados a nisina, são encontrados também os casos da proteína de imunidade putativa e Proteína de imunidade de bacteriocina AbpIM - estes presentes nos genomas que possuem a produção das demais bacteriocinas citadas em conjunto. Outra característica interessante, seria a presença exclusiva da transposase ISDha13 família IS200/IS605 que ocorre apenas nos genomas/fragmentos contendo outras bacteriocinas. Com exceção das cepas que apresentam fragmentos codificantes conjuntos com outras bacteriocinas, nenhuma transposase ou elementos genéticos móveis, como também genes de manutenção do plasmídeo, foram identificados próximos as AOIs da nisina F, sendo possível presumir que esta é pouco afetada pelo mobiloma em *L. salivarius*, ou que o mesmo encontra-se relacionado com o contexto cromossomal na espécie.

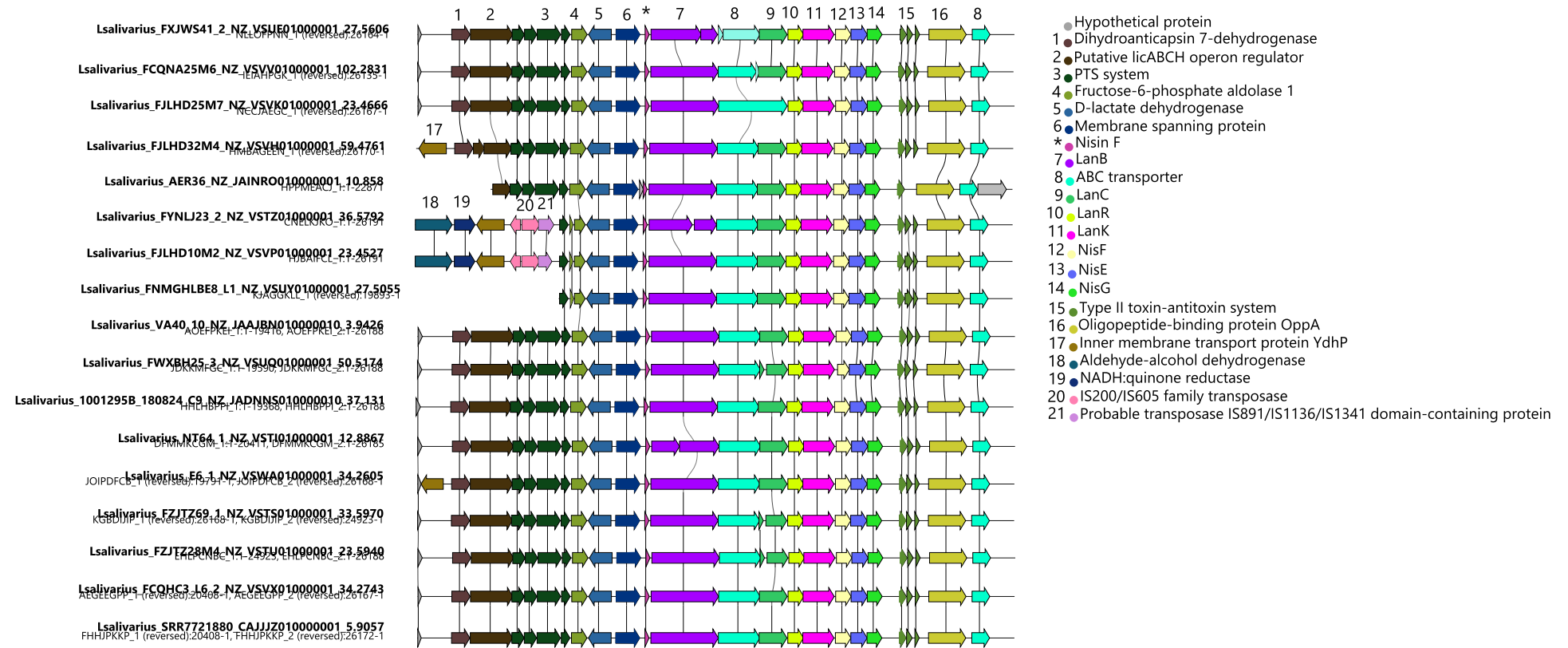


Figura 26. Sintenia das AOIs de nisina F identificadas nos genomas de *L. salivarius*. Para melhor representação, algumas sequências que compartilham > 95% de identidade e > 95% da cobertura da AOI não foram mostradas.

As áreas de interesse encontradas que abrigam os genes codificadores da enterocina MR10B (Figura 27), quando comparadas às outras AOIs que contém as demais bacteriocinas, apresentam um perfil gênico menos abundante no que diz respeito a presença de outras bacteriocinas coexistindo em uma mesmo contexto. Essas áreas, contudo, são ricas na presença de elementos genéticos móveis, como o caso da transposase ISMmu1 da família IS200/IS605, da transposase do transposon Tn916 e da transposase ISDge19 também da família IS200/IS605 indicando, assim, uma forte influência do mobiloma de *L. salivarius* nestas AOI. Além disso, genes relacionados à dinâmica plasmidial - como, da proteína de partição cromossômica Smc, da proteína de ligação ao ADN de replicação de plasmídeo e da proteína de transferência conjugal; indicando sua possível inserção no material genético do plasmídeo desse microrganismo

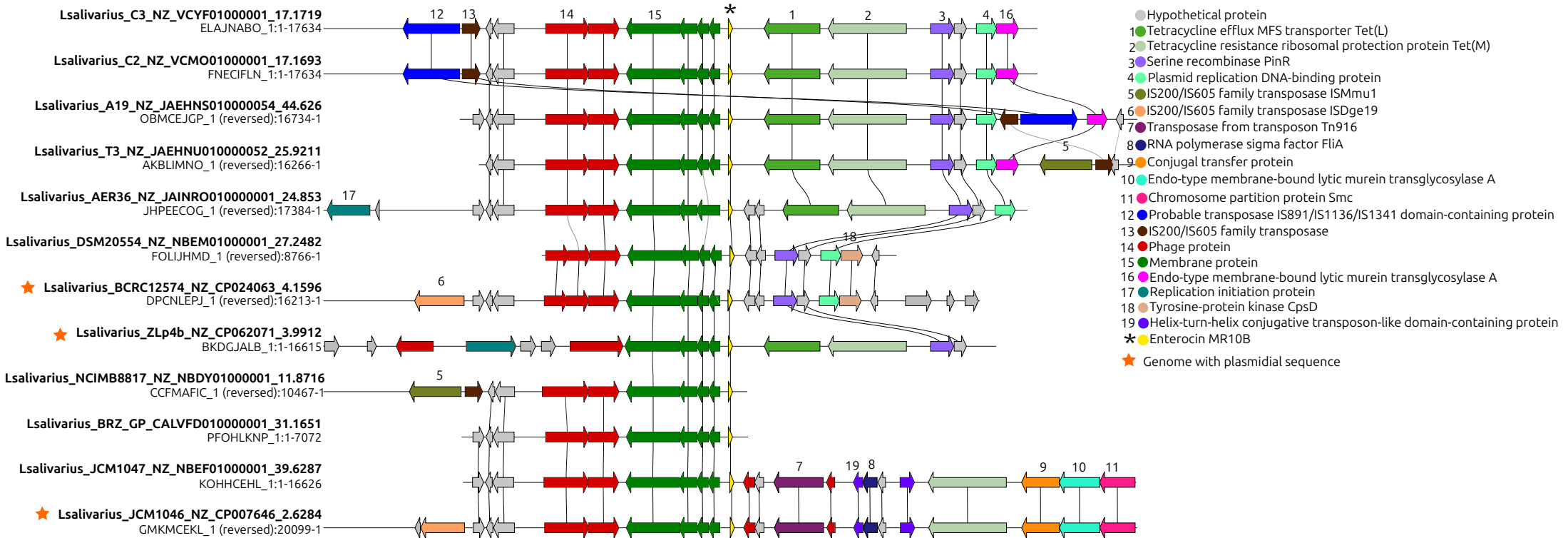


Figura 27. Sintenia das AOIs de enterocina MR10B identificadas nos genomas de *L. salivarius*.

Outras bacteriocinas são preditas nas suas diferentes cadeias ou subunidades, gerando, assim, possíveis predições diferenciais quanto a sua mútua presença em um mesmo genoma. Essas proteínas são funcionais a partir da combinação de tais cadeias formando dímeros sendo o caso da salivaricina P (Barrett *et al.*, 2007) ou nos casos plantaricina S (Ekblad; Kristiansen, 2019) e lactacina F (Negash *et al.*, 2020) no qual os dois peptídeos atuam sinergicamente promovendo a interação antimicrobiana - essas estruturas constituem dois segmentos transmembranares capazes de promover a formação de poros nas células-alvo conjuntamente (Kawai *et al.*, 2004; Kaur; Kaur, 2015).

Esse é o caso da lactacina F, no qual observa-se por meio do modelo de predição usado uma subdivisão genética em duas estruturas, sendo um gene codificante da subunidade *lafX* (Figura 28) que se encontra em uma frequência menor quando comparada ao gene codificante da subunidade *lafA* (Figura 29). Essa predição diferencial pode representar ou uma inativação da bacteriocina por perda de uma de suas estruturas ou a não dependência de ambas em sua atuação. De maneira geral, a lactacina F compartilha sua área de interesse com outras bacteriocinas ocasionalmente, como acidocina MR10B, salivaricina P, nisina F, plantaricina NC8, plantaricina S e bacteriocina LS2. Em todos os quatro casos de predição para a subunidade *lafX*, a mesma esteve mutuamente presente em um genoma de uma cepa produtora de nisina F, além de apresentar um contexto genômico muito conservado (Figura 28).

A subunidade *lafA*, demonstra, por sua vez, também um contexto genômico bem conservado, contendo, a exceção, na cepa T3 a presença de elementos móveis como a transposase IS1223 da família IS3 e da proteína Cas2, endoribonuclease associada a CRISPR. Outro traço interessante sobre esse grupo e suas AOs seriam vistos nas cepas CCuG44481 e An84, no qual a primeira contém em sua predição o gene da enzima Undecaprenil-difosfatase ligada a resistência frente a antibióticos, já a segunda apresentando um evento de duplicação com duas cópias para a subunidade *lafA* da lactacina F, bem como para plantaricina NC8 e plantaricina S.

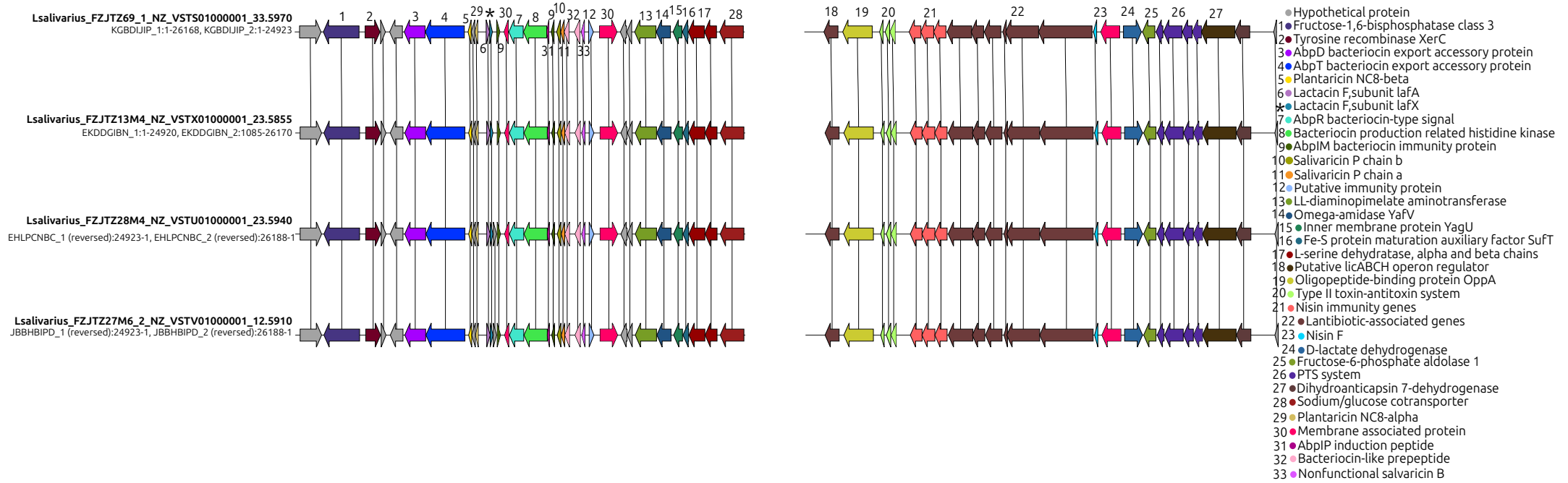


Figura 28. Sintenia das AOIs de lactacina F subunidade lafX identificadas nos genomas de *L. salivarius*.

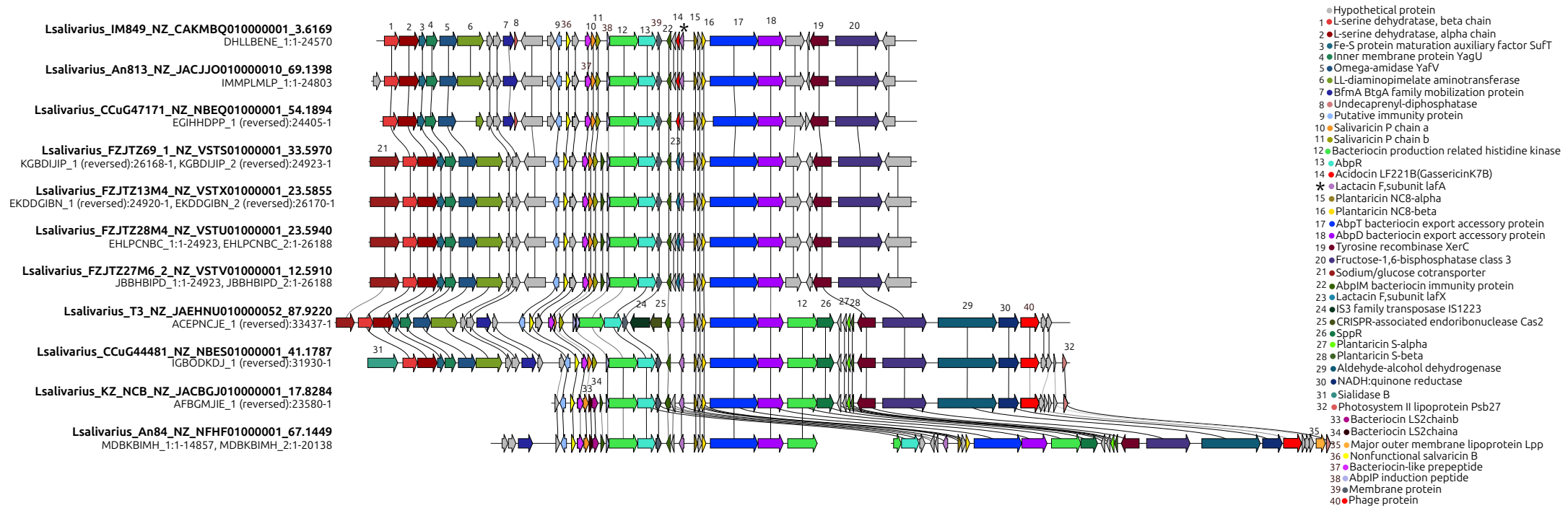


Figura 29. Sintenia das AOIs de lactacina F subunidade lafA identificadas nos genomas de *L. salivarius*.

Outro caso de bacteriocina predita em duas estruturas - alfa e beta - seria a plantaricina NC8, porém essa predição diferencial só se foi possível por meio do refinamento utilizado pelo banco de dados diferencial elaborado, ou seja, com a predição utilizando somente o repertório do BAGEL4 não foi verificada a presença dos dois genes codificantes, sendo somente notória a existência da estrutura referente a plantaricina NC8-alfa (Figura 30). Contudo, diferentemente da lactacina F, tanto alfa quanto beta são encontradas na mesma área de interesse em todas as ocasiões de sua detecção.

Assim como ocorrido na maioria dos casos anteriores, plantaricina NC8 foi predita em AOIs que abrigam também outras bacteriocinas - acidocina MR10B, salivaricina P, nisina F, Lactacina F, plantaricina S e bacteriocina LS2. Não contém, de acordo com os resultados visualizados, estruturas ligadas a um possível genoma plasmidial.

Para plantaricina S (Figura 31) e salivaricina P (Figura 32), encontramos em ambos os casos contextos genômicos conservados e partilhando, em algumas cepas, a sua ocorrência conjunta, contendo genomas que apresentam sequências plasmidiais descritas.

Com base nessas observações, poderíamos definir descrição a respeito dos possíveis contextos genômico para as AOIs encontradas. Poderíamos presumir que das 608 AOIs identificadas como detentoras de bacteriocinas pela ferramenta BAGEL4, 12 dessas continham um contexto plasmidial - contendo genes envolvidos com a manutenção desse material, além de estarem vinculados com elementos genéticos móveis; 271 áreas de interesse com a bacteriocina estando inserida em genes de origem viral - o caso da enterolisina A I entre fatores resquiciais de bacteriófagos - e as demais 259 sem uma determinação evidente - ausência de genes plasmidiais ou bacteriófagos; o que pode indicar sua inserção no contexto cromossomal.

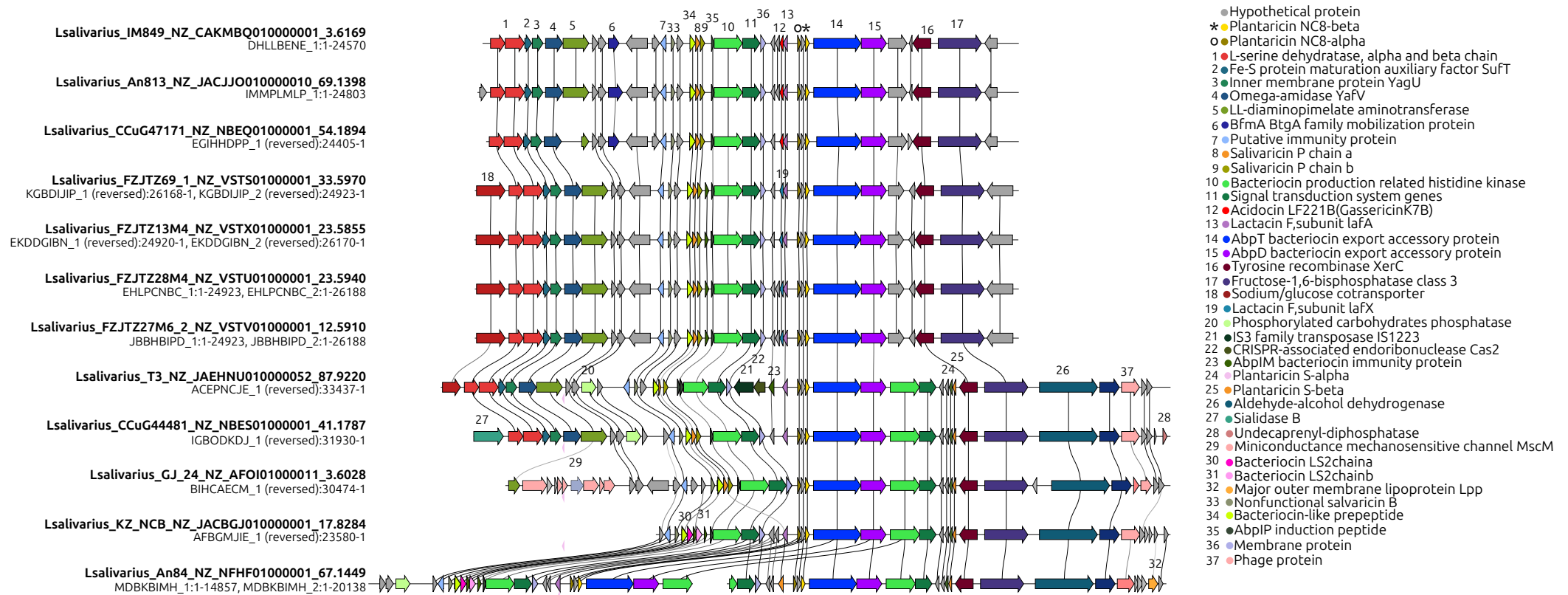


Figura 30. Sintenia das AOIs de plantaricina NC8 identificadas nos genomas de *L. salivarius*.

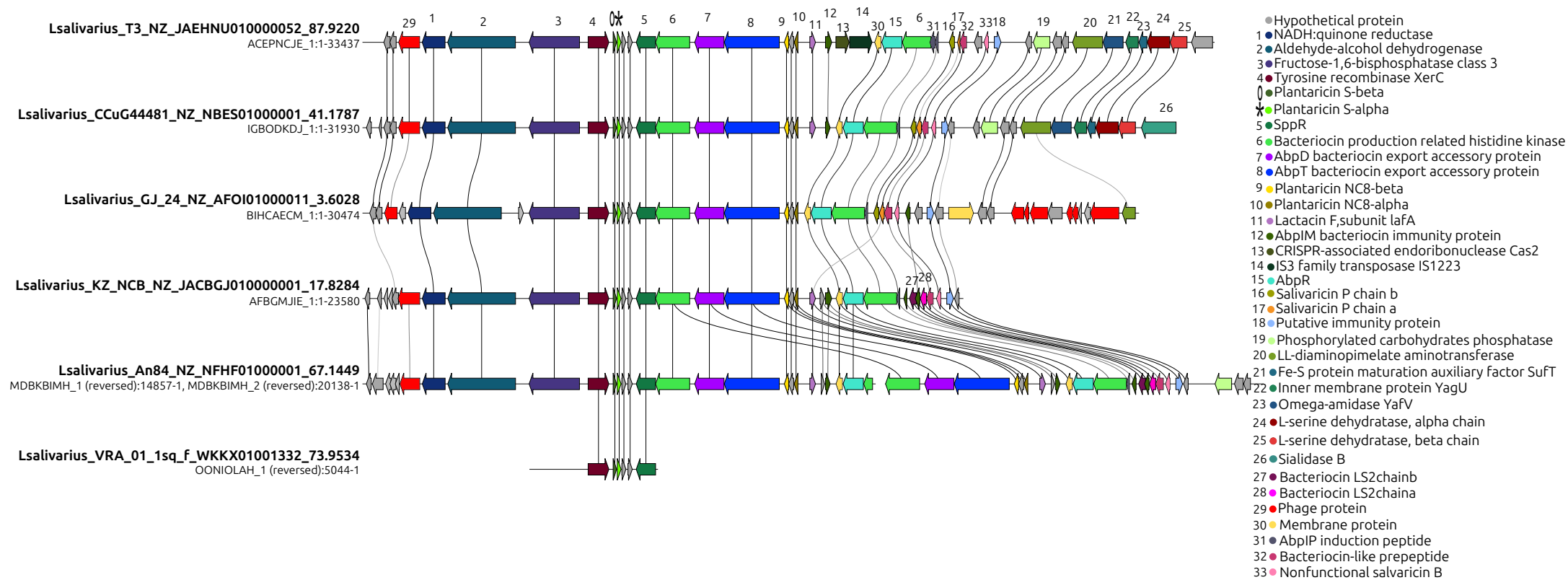


Figura 31. Sintenia das AOIs de plantaricina S identificadas nos genomas de *L. salivarius*.

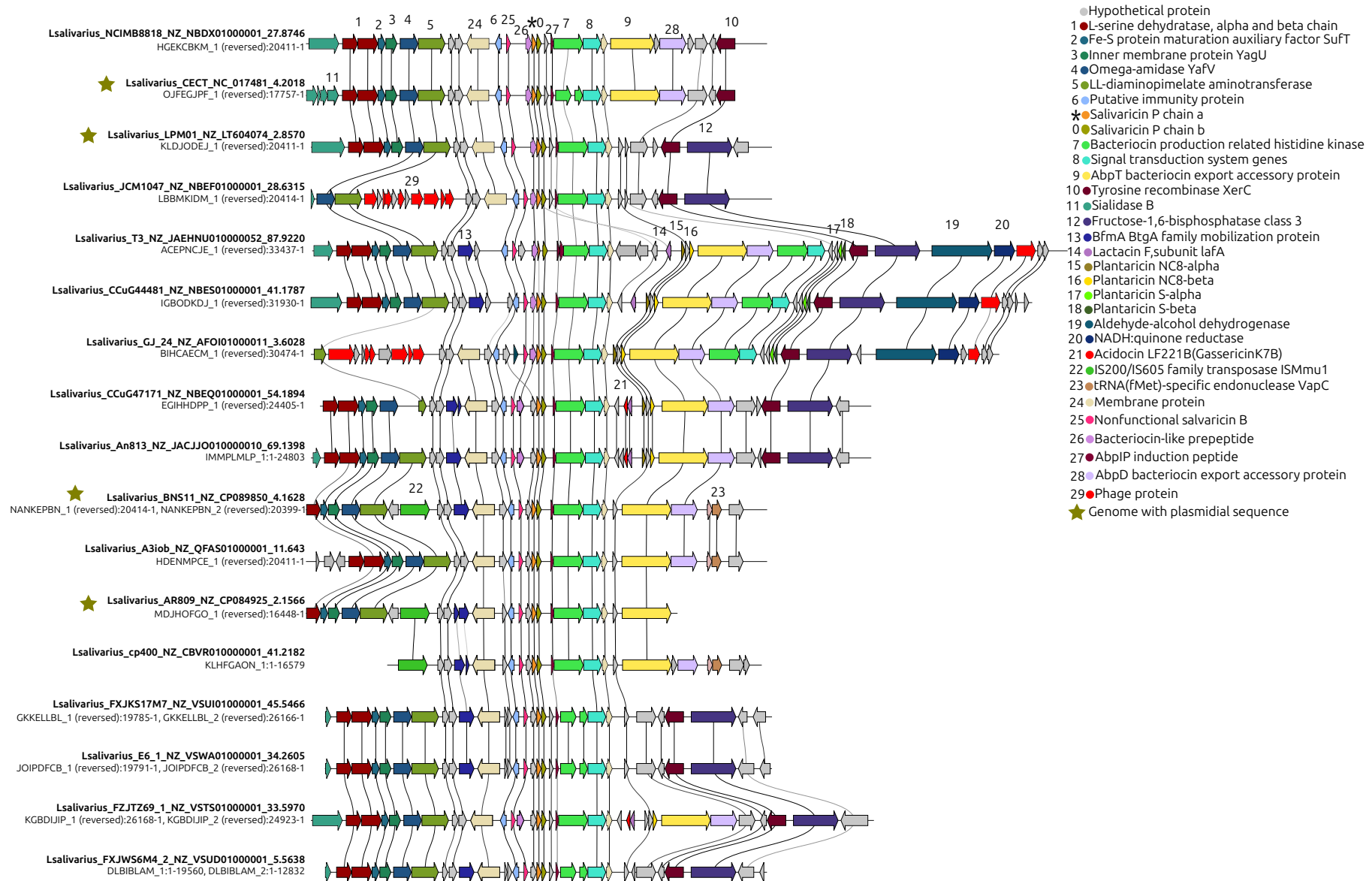


Figura 32. Sintenia das AOIs de salivarin P identificadas nos genomas de *L. salivarius*. Para melhor representação, algumas sequências que compartilham > 95% de identidade e > 95% da cobertura da AOI não foram mostradas.

5 DISCUSSÃO

Dentro de um cenário cada vez mais delicado em relação à resistência bacteriana, a possibilidade de serem aplicados os produtos peptídicos da espécie *Ligilactobacillus salivarius* como potenciais fatores antimicrobianos direcionados a saúde pública e produção pecuária, representa uma alternativa viável e significativa (Guerrero Sanchez *et al.*, 2022). Nesse sentido, o estudo realizado, analisando todos os genomas disponíveis desta espécie até então, pode revelar a existência de uma diversidade de componentes proteicos de interesse para o contexto mencionado.

No caso específico da espécie *L. salivarius*, foram obtidos 216 genomas a partir de amostras coletadas em diversos países. No entanto, foi observado que a grande maioria dos isolados foram obtidos na China, o que pode gerar um viés na análise dos dados. Isso ocorre porque a variação genética pode ser influenciada por fatores como a localização geográfica, o tipo de ambiente e a população em que a espécie está presente (Wood *et al.*, 2022). Porém, nossos resultados indicam que a origem geográfica, bem como a origem de isolamento, não se mostrou como um fator correlacionado com a existência de um padrão genético em relação a predição de bacteriocinas.

Com as 215 cepas que passaram no primeiro filtro de corte em relação à completude e contaminação dos genomas publicados, foi possível realizar a construção e posterior análise pangenômica referente a essa espécie. Ao passo que a análise sequencial das bacteriocinas pode apresentar um grande número de informações importantes para compreensão diferencial evolutiva das mesmas, ou seja, características peculiares ainda acabam passando despercebidas.

Dos dados obtidos pelo método mencionado, é possível observar que a curva de acumulação apresentada pelo pangenoma sugere um cenário de pangenoma aberto. Isso ocorre mesmo quando um aparente padrão estável de ganho e perda de genes é evidenciado no gráfico filogenético das cepas. Isso implica que o número total de genes em *L. salivarius* aparenta não ter atingido uma estabilização e pode indicar uma ampla diversidade de genes ainda não identificados entre as diferentes cepas dessa espécie bacteriana.

Além disso, quando se examina a filogenia das cepas encontradas, é perceptível uma dificuldade em estabelecer uma correlação no repertório bacteriocinogênico. Essa observação sugere uma adaptação independente da cepa ao ambiente ao qual está exposta.

Analizando mais profundamente o perfil genético desse pangenoma, revelou-se que a maioria dos genes encontrados estão associados a funções desconhecidas, mas também foram identificados vários COGs proeminentes, como Replicação, recombinação e reparo, Biogênese da parede celular/membrana/envelope, Transcrição, Mecanismos de defesa, Transporte e metabolismo de carboidratos e Transporte e metabolismo de aminoácidos. Porém, estes COGs estão primariamente relacionados com funções do metabolismo básico. Nossos resultados também revelaram a presença de 17 tipos de bacteriocinas sintetizadas por este grupo, sendo distribuídas nas três classes utilizadas pelo sistema da ferramenta BAGEL4.

Os resultados indicam que a presença de bacteriocinas no grupo é muito evidente e diversa, com conteúdo genético adjacente altamente variável. A Enterolisina A I e II representou a maioria das regiões codificadoras de bacteriocinas para os genomas obtidos, esse fator pode também implicar na presença de uma maior variabilidade de padrões gênicos codificantes para tais proteínas, tendo em vista as diferenças demonstradas no alinhamento das sequências preditas.

As análises de correlação mostraram que há uma relação significativa entre os genes LS2 cadeia alfa e LS2 cadeia beta, bem como entre as bacteriocinas plantaricina S alfa e beta e Salivaricina P cadeia alfa e beta, indicando as interações funcionais conjuntas entre tais peptídeos. Além disso, os resultados apresentaram uma correlação entre a presença conjunta dos genes responsáveis pelas modificações pós-traducionais das bacteriocinas e a presença da Nisina F, algo já esperado pela descrição literária do grupo ao qual essa proteína está integrada (Wu *et al.*, 2022).

Tendo se estabelecido o perfil de bacteriocinas para a espécie, procedeu-se uma verificação das possíveis diferenças, bem como a predição da estrutura tridimensional, com a finalidade de gerar uma compreensão do seu possível mecanismo molecular. Nossos resultados e opção por método estão em

consonância com estudos recentes que também utilizam dessa ferramenta Alphafold 2 em suas análises (Jumper *et al.*, 2021; Senior *et al.*, 2021). A precisão da modelagem de proteínas alcançada pelo software permite uma compreensão mais aprofundada das interações entre proteínas e moléculas alvo (Adams *et al.*, 2021).

Em relação ao refinamento, a ferramenta utiliza uma abordagem de simulação de dinâmica molecular e pode ajustar a estrutura das proteínas de acordo com dados experimentais disponíveis, além de otimizar a estabilidade da estrutura em condições fisiológicas (Yang *et al.*, 2016). Por meio do seu uso é possível a obtenção de melhorias significativas na precisão e qualidade das estruturas de proteínas modeladas (Ryu *et al.*, 2019).

Apesar de grande parte dessas proteínas antimicrobianas possuírem uma conservação muito evidente em relação a suas sequências, alguns grupos, principalmente os mais frequentes, demonstraram variações mutacionais significativas quanto a composição de aminoácidos de suas cadeias, indicando um dinamismo genético em relação a esses genes.

Em relação à predição estrutural, apenas 11 bacteriocinas apresentaram certa similaridade com estruturas já descritas e apresentadas publicamente, sendo que apenas a enterolisina A I e II, obtiveram uma similaridade observada pela presença compartilhada de duas alfa hélices em sua estrutura predita, e compartilhando nove folhas beta alinhadas - contudo, a enterolisina A I apresenta outras duas folhas beta que possuem suas sequências ausentes tanto na enterolisina A II, quanto no modelo melhor modelo encontrado pelo BLAST (Figura 11). Dessa maneira, os modelos 3D construídos poderão servir como boa base para compreensões futuras das dinâmicas dessas proteínas bem como possíveis ações funcionais conjuntas, uma vez que nenhum estava disponível anteriormente.

A análise de genômica comparativa entre as AOI, indicou a presença de padrões distintos entre os diferentes grupos de bacteriocinas, corroborando a já conhecida plasticidade observada nos genomas bacterianos (Das *et al.*, 2022).

Foi observado que várias bacteriocinas, como lactacina F subunidade lafA, plantaricina NC8, plantaricina S e bacteriocina LS2 (por exemplo, nas cepas KZ-NCB e An84), estão presentes juntas em uma mesma área de interesse ou no

mesmo genoma. Isso indica que uma única cepa pode ser capaz de produzir mais de um tipo de bacteriocina. Além disso, em algumas dessas áreas de interesse, onde essas bacteriocinas estão presentes, não foram identificados elementos genéticos móveis ou genes de manutenção de plasmídeos, o que revela uma intensa dinâmica e diversidade gênica associada a esses fatores. Nossos resultados sugerem que diversas AOI podem estar em uma posição vinculada a plasmídeos conjugativos.

Foram identificados genes de imunidade que configuram a resistência frente ao peptídeo antimicrobiano produzido pela mesma, mas em certos casos tais fatores não se mostraram presentes na mesma AOI da bacteriocina, indicando um possível mecanismo de defesa contra a ação dessas proteínas mais complexos com ativações em regiões distintas ao sítio codificante da bacteriocina.

O caso mais curioso implica nas duas variações para a bacteriocina enterolisina A preditas pelo BAGEL4, denominadas no trabalho como enterolisina A I e A II. Em ambos os casos, as duas formas da bacteriocina podem ser encontradas presentes simultaneamente no mesmo genoma. Porém, curiosamente identificou-se nas AOIs referentes a enterolisina A I a presença de proteínas de origem viral ao redor da bacteriocina visualizada, podendo se aludir a sua formação, inserção ou mobilidade de tal gene para a espécie em questão por meio do ciclo lisogênico de bacteriófagos.

6 CONCLUSÃO

Com esse estudo conseguimos ampliar a compreensão, com base na investigação genômica, sobre o conteúdo bacteriocinogênico da espécie *Ligilactobacillus salivarius*. Esse fato é visível através da predição de bacteriocinas de classe 1 e 3 - anteriormente não mencionadas para a espécie - como fatores antimicrobianos direcionados para a saúde pública e produção pecuária, em um cenário de crescente resistência bacteriana, bem como os demais peptídeos de classe 2 apresentados e caracterizados estruturalmente, sendo assim resultados a serem considerados em futuras aplicabilidades de seus componentes em um interesse socioeconômico.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, P. D. *et al.* Protein structures by AlphaFold, **Nature**, v. 596, n. 7873, p. 583-589, 2021.
- AKAIKE, H. A new look at the statistical model identification. **IEEE transactions on automatic control**, 19(6), 716-723. 1974
- ARSÈNE, M. M. J. *et al.* The use of probiotics in animal feeding for safe production and as potential alternatives to antibiotics. **Veterinary World**, v. 14, n. 2, p. 319, 2021.
- ASHAOLU, T. J. Immune boosting functional foods and their mechanisms: A critical evaluation of probiotics and prebiotics. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 130, p. 110625, 2020.
- AYUKEKBONG, J. A.; NTEMGWA, M.; ATABE, A. N. The threat of antimicrobial resistance in developing countries: causes and control strategies. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2017.
- AZAD, Md. A. K. *et al.* Immunomodulatory effects of probiotics on cytokine profiles. **BioMed research international**, v. 2018, 2018.
- BANG, W. Y. *et al.* A Quadruple Coating of Probiotics for Enhancing Intestinal Adhesion and Competitive Exclusion of Salmonella Typhimurium. **Journal of Medicinal Food**, v. 25, n. 2, p. 213-218, 2022.
- BANGAR, S. P. *et al.* Organic acids production from lactic acid bacteria: A preservation approach. **Food Bioscience**, v. 46, p. 101615, 2022.
- BARCENILLA, C. *et al.* Application of lactic acid bacteria for the biopreservation of meat products: A systematic review. **Meat Science**, v. 183, p. 108661, 2022.
- BARRETT, E. *et al.* Salivaricin P, One of a Family of Two-Component Antilisterial Bacteriocins Produced by Intestinal Isolates of *Lactobacillus salivarius*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 73 (11). 2007.
- BARZEGARI, A. *et al.* The battle of probiotics and their derivatives against biofilms. **Infection and drug resistance**, p. 659-672, 2020.
- BERMAN, H. M. *et al.* The protein data bank. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 1, p. 235-242, 2000.
- CHEN, R. *et al.* Dietary Exposure to Antibiotic Residues Facilitates Metabolic Disorder by Altering the Gut Microbiota and Bile Acid Composition. **Msystems**, v. 7, n. 3, p. e00172-22, 2022.

CORR, S. C. *et al.* Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 18, p. 7617-7621, 2007.

COSIMI, L. A. *et al.* Integrated clinical and quality improvement coaching in Son La Province, Vietnam: a model of building public sector capacity for sustainable HIV care delivery. **BMC health services research**, v. 15, n. 1, p. 1-9, 2015.

DARBANDI, A. *et al.* Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 36, n. 1, p. e24093, 2022.

DAS, S. *et al.* Genome plasticity as a paradigm of antibiotic resistance spread in ESKAPE pathogens. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 27, p. 40507-40519, 2022.

DAYEM, M. A. *et al.* The putative immunity protein of the Gram-positive bacteria *Leuconostoc mesenteroides* is preferentially located in the cytoplasm compartment. **FEMS microbiology letters**, v. 138, n. 2-3, p. 251-259, 1996.

DICKS, L. *et al.* A review: the fate of bacteriocins in the human gastro-intestinal tract: do they cross the gut–blood barrier?. **Frontiers in Microbiology**, p. 2297, 2018.

DOBSON, A. *et al.* Bacteriocin production: a probiotic trait?. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 1, p. 1-6, 2012.

EKBLAD, B.; KRISTIANSEN, P. E. NMR structures and mutational analysis of the two peptides constituting the bacteriocin plantaricin S. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2019.

FAO/OMS. Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. **FAO food and nutrition**. paper 85, 2006.

FELICIO, B. A. *et al.* A. Effects of nisin on *Staphylococcus aureus* count and physicochemical properties of Minas Frescal cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 7, p. 4364-4369, 2015.

GABRIELSEN, C. *et al.* Circular bacteriocins: biosynthesis and mode of action. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 22, p. 6854-6862, 2014.

GASTEIGER, E. *et al.* Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. **Protocol**, The Proteomics Protocols Handbook, p. 571- 607, 2005.

GILCHRIST, C. L. M.; CHOOI, Y. Clinker & clustermap. js: Automatic generation of gene cluster comparison figures. **Bioinformatics**, v. 37, n. 16, p. 2473-2475, 2021.

GOU, H. *et al.* How do intestinal probiotics restore the intestinal barrier?. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022.

GRADISTEANU PIRCALABIORU, G. *et al.* Bacteriocins in the era of antibiotic resistance: Rising to the challenge. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 2, p. 196, 2021.

GUERRERO SANCHEZ, M. *et al.* *Ligilactobacillus salivarius* functionalities, applications, and manufacturing challenges. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 106, p. 57-80, 2022.

GURUPRASAD, K.; REDDY, B. V. B.; PANDIT, M. W. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. **Protein Engineering**, v. 4, n. 2, p. 155-161, 1990.

HAMMAMI, R. *et al.* BACTIBASE second release: a database and tool platform for bacteriocin characterization. **BMC microbiology**, v. 10, n. 1, p. 1-5, 2010.

HAMMES, W. P.; WEISS, N.; HOLZAPFEL, W. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium* in: **Balows**; A., HG Trüper, M. Dworkin, W. Harder u. KH Schleifer (Hrsg.): *The Prokaryotes*, Vol. II, Chapter 70. 1992.

HENG, N. C. K.; TAGG, J. R. What's in a name? Class distinction for bacteriocins. *Nature Reviews Microbiology*, v. 4, n. 2, p. 160-160, 2006.

HEO, L.; PARK, H.; SEOK, C. GalaxyRefine: Protein structure refinement driven by side-chain repacking. **Nucleic acids research**, v. 41, n. W1, p. W384-W388, 2013.

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**, 2014.

JUMPER, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, v. 596, n. 7873, p. 583-589, 2021.

KALYAANAMOORTHY, S. *et al.* ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. **Nature methods**, v. 14, n. 6, p. 587-589, 2017.

KATO, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 4, p. 772-780, 2013.

KATZ, L.; BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 2-3, p. 155-176, 2016.

KAUR, S.; KAUR, S. Bacteriocins as potential anticancer agents. **Frontiers in pharmacology**, v. 6, p. 272, 2015.

KAWAI, Y. *et al.* The circular bacteriocins gassericin A and circularin A. **Current Protein and Peptide Science**, v. 5, n. 5, p. 393-398, 2004.

KIRCHHELLE, C. Pharming animals: a global history of antibiotics in food production (1935–2017). **Palgrave Communications**, v. 4, n. 1, p. 1-13, 2018.

KORKMAZ KIRAKLI, E.; OZTEKIN, O. Is hippocampal avoidance during whole-brain radiotherapy risky for patients with small-cell lung cancer? Hippocampal metastasis rate and associated risk factors. **Technology in Cancer Research & Treatment**, v. 16, n. 6, p. 1202-1208, 2017.

KUMAR, S. *et al.* In vitro screening for potential probiotic properties of *Ligilactobacillus salivarius* isolated from cattle calves. **Current Research in Biotechnology**, v. 4, p. 275-289, 2022.

KUMARIYA, R. *et al.* Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. **Microbial pathogenesis**, v. 128, p. 171-177, 2019.

LASKOWSKI, R. A *et al.* PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of applied crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283-291, 1993.

LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. **Nucleic acids research**, v. 49, n. W1, p. W293-W296, 2021.

LIU, Y.; WANG, J.; WU, C. Modulation of gut microbiota and immune system by probiotics, pre-biotics, and post-biotics. **Frontiers in nutrition**, v. 8, p. 1155, 2022.

MARTÍN, R. *et al.* *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother–child pair. **International journal of food microbiology**, v. 112, n. 1, p. 35-43, 2006.

MEADE, E.; SLATTERY, M. A.; GARVEY, M. Bacteriocins, potent antimicrobial peptides and the fight against multi drug resistant species: resistance is futile?. **Antibiotics**, v. 9, n. 1, p. 32, 2020.

MOHR, K. I. History of antibiotics research. **How to Overcome the Antibiotic Crisis**, p. 237-272, 2016.

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.

MORELLI, L.; VON WRIGHT, A. Genetics of lactic acid bacteria. **Lactic acid Bacteria**, p. 17-32, 2019.

MOZZY, F. F.; RAYA, R. R.; VIGNOLO, G. M. **Biotechnology of lactic acid bacteria novel applications**. 1^a ed. Ames: Wiley Blackwell, 408p. 2010.

MULANI, M. S. *et al.* Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: a review. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 539, 2019.

NALLA, K. *et al.* Impact of probiotics on dairy production efficiency. **Frontiers in microbiology**, p. 1519, 2022.

NEGASH, A. W. *et al.* Current applications of bacteriocin. **International Journal of Microbiology**. 2020.

NGUYEN, L. *et al.* IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. **Molecular biology and evolution**, v. 32, n. 1, p. 268-274, 2015.

NIEWOLD, T. A. The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. **Poultry science**, v. 86, n. 4, p. 605-609, 2007.

OPPEGÅRD, C. *et al.* The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. **Microbial Physiology**, v. 13, n. 4, p. 210-219, 2007.

O'SHEA, E. F. *et al.* Production of multiple bacteriocins from a single locus by gastrointestinal strains of *Lactobacillus salivarius*. **Journal of bacteriology**, v. 193, n. 24, p. 6973-6982, 2011.

PARKS, D. H. *et al.* CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. **Genome research**, v. 25, n. 7, p. 1043-1055, 2015.

PAUL, A. K.; SAIKAT, A. S. M. An in silico approach for structural and functional annotation of matrix protein of *Nipah henipavirus*: A protein functional analysis. **ChemRxiv**. 2021.

PEREIRA, W. A. *et al.* Use of probiotic bacteria and bacteriocins as an alternative to antibiotics in aquaculture. **Microorganisms**, v. 10, n. 9, p. 1705, 2022.

PEREZ, R. H.; ZENDO, T.; SONOMOTO, K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. **Microbial cell factories**, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2014.

PINO, A. *et al.* Detection of vaginal lactobacilli as probiotic candidates. **Scientific Reports**. v. 9, n. 1, p. 1-10, 2019.

PRECIADO, G. M. *et al.* Bacteriocins and its use for multidrug-resistant bacteria control. **Antibiotic Resistance: Mechanisms and New Antimicrobial Approaches**, p. 329-349, 2016.

RESEARCH AND MARKETS. **Global Probiotics Market by Product Type (Functional Food & Beverages, Dietary Supplements, and Feed), Ingredient (Bacteria and Yeast), End User (Human and Animal), Distribution Channel, and Region - Forecast to 2027**. Markets and Markets Research. 259p. 2022.

RILEY, M. A.; WERTZ, J. E. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 117-137, 2002.

RUIZ RODRÍGUEZ, L. G. *et al.* Diversity and functional properties of lactic acid bacteria isolated from wild fruits and flowers present in Northern Argentina. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 1091, 2019.

RYU, J. *et al.* GalaxyRefine: Protein structure refinement driven by side-chain repacking. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. W1, p. W451-W455, 2019.

SEEMANN, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, v. 30, n. 14, p. 2068-2069, 2014.

SENGUPTA, S.; CHATTOPADHYAY, M. K.; GROSSART, H. P. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 47, 2013.

SENIOR, A. W. *et al.* Improved protein structure prediction using potentials from deep learning. **Nature**, v. 577, n. 7792, p. 706-710, 2021.

SHALLCROSS, L. J.; DAVIES, D. S. C. Antibiotic overuse: a key driver of antimicrobial resistance. **British Journal of General Practice**, v. 64, n. 629, p. 604-605, 2014.

SIMÃO, F. A. *et al.* BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. **Bioinformatics**, v. 31, n. 19, p. 3210-3212, 2015.

SIMONS, A.; ALHANOUT, K.; DUVAL, R. E. Bacteriocins, antimicrobial peptides from bacterial origin: Overview of their biology and their impact against multidrug-resistant bacteria. **Microorganisms**, v. 8, n. 5, p. 639, 2020.

SITAILO, L. A. *et al.* The *Bacteroides fragilis* BtgA mobilization protein binds to the oriT region of pBFTM10. **Journal of bacteriology**, v. 180, n. 18, p. 4922-4928, 1998.

SMYSHLYAEV, G.; BATEMAN, A.; BARABAS, O. Sequence analysis of tyrosine recombinases allows annotation of mobile genetic elements in prokaryotic genomes. **Molecular systems biology**, v. 17, n. 5, p. e9880, 2021.

TARRADAS, J. *et al.* The control of intestinal inflammation: A major objective in the research of probiotic strains as alternatives to antibiotic growth promoters in poultry. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, p. 148, 2020.

TODOROV, S. D. *et al.* Bacteriocins from LAB and other alternative approaches for the control of *Clostridium* and *Clostridiodes* related gastrointestinal colitis. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, p. 1088, 2020.

TONKIN-HILL, G. *et al.* Robust analysis of prokaryotic pangenome gene gain and loss rates with Panstripe. **Genome Research**, v. 33, n. 1, p. 129-140, 2023.

TONKIN-HILL, G. *et al.* Producing polished prokaryotic pangenomes with the Panaroo pipeline. **Genome biology**, v. 21, n. 1, p. 1-21, 2020.

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.

WANG, C. *et al.* Defeating antibiotic-resistant bacteria: exploring alternative therapies for a post-antibiotic era. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 3, p. 1061, 2020.

WANG, Y. *et al.* Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 9, p. 612285, 2021.

WILKINSON, D. L. *et al.* Amino acid scale representations for protein structure prediction. **Protein Engineering**, v. 5, n. 3, p. 191-196, 1992.

WOOD, G. *et al.* Host genetics, phenotype and geography structure the microbiome of a foundational seaweed. **Molecular Ecology**, v. 31, n. 7, p. 2189-2206, 2022.

WU, J. *et al.* Nisin: From a structural and meat preservation perspective. **Food Microbiology**, p. 104207, 2022.

YANG, Y. *et al.* GalaxyRefine2: simultaneous refinement of inaccurate local regions and overall protein structure. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. W1, p. W416-W423, 2016.

YANG, S. *et al.* Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 241, 2014.

ZHANG, C. *et al.* The potential of proteins, hydrolysates and peptides as growth factors for *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*: Current research and future perspectives. **Food & function**, v. 11, n. 3, p. 1946-1957, 2020.

ZHANG, S; CHEN, D-C. Facing a new challenge: the adverse effects of antibiotics on gut microbiota and host immunity. **Chinese medical journal**, v. 132, n. 10, p. 1135-1138, 2019.

ZHANG, M. *et al.* Effects of *Lactobacillus salivarius* Ren on cancer prevention and intestinal microbiota in 1, 2-dimethylhydrazine-induced rat model. **Journal of microbiology**, v. 53, n. 6, p. 398-405, 2015.

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**, 2020.

ZHOU, B. *et al.* Selection of Immunobiotic *Ligilactobacillus salivarius* strains from the intestinal tract of wakame-fed pigs: functional and genomic studies. **Microorganisms**, v. 8, n. 11, p. 1659, 2020.