

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA INTERUNIDADES DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOINFORMÁTICA

**HASSAN MARTINS MAGALHÃES**

**PROBIOGENÔMICA PARA IDENTIFICAÇÃO *IN SILICO* DE MECANISMOS  
PROBIÓTICOS EM *PEDIOCOCCUS ACIDILACTICI* PA13**

Belo Horizonte, MG

2025

**HASSAN MARTINS MAGALHÃES**

**PROBIOGENÔMICA PARA IDENTIFICAÇÃO *IN SILICO* DE MECANISMOS  
PROBIÓTICOS EM *PEDIOCOCCUS ACIDILACTICI* PA13**

Dissertação apresentada ao Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioinformática.

**Orientador:** Prof. Dr. Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho

**Co-orientador:** Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo

Belo Horizonte, MG

2025

043

Magalhães, Hassan Martins.

Probiogenômica para identificação in silico de mecanismos probióticos em *Pediococcus acidilactici* Pa13 [manuscrito] / Hassan Martins Magalhães. – 2025.

58 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho. Co-orientador: Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática.

1. Bioinformática. 2. Probióticos. 3. *Pediococcus acidilactici*. 4. Genômica. 5. Resistência Microbiana a Medicamentos. 6. Filogenia. I. Carvalho, Rodrigo Dias de Oliveira. II. Azevedo, Vasco Ariston de Carvalho. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 573:004



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FOLHA DE APROVAÇÃO

**Hassan Martins Magalhães**

**"PROBIOGENÔMICA PARA IDENTIFICAÇÃO IN SILICO DE MECANISMOS PROBIÓTICOS EM  
PEDIOCOCCUS ACIDILACTICI PA13"**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho - Orientador  
UFMG

Prof. Flaviano dos Santos Martins  
UFMG

Prof. Sandeep Tiwari  
UFBA

Belo Horizonte, 31 de julho de 2025.



Documento assinado eletronicamente por **Sandeep Tiwari, Usuário Externo**, em 31/07/2025, às 11:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho, Usuário Externo**, em 31/07/2025, às 12:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flaviano dos Santos Martins, Professor do Magistério Superior**, em 01/08/2025, às 16:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **4416227** e o código CRC **D425BE12**.

## AGRADECIMENTOS

Chegar até aqui foi um caminho construído com muitos desafios, aprendizados, noites mal dormidas e, acima de tudo, com o apoio incondicional de pessoas que foram fundamentais em minha trajetória. Esta dissertação é resultado não apenas do meu esforço pessoal, mas da contribuição e presença de muitos que caminharam ao meu lado, direta ou indiretamente. Por isso, expresso aqui minha sincera e profunda gratidão.

Agradeço, com toda minha fé, a Deus, que me concedeu saúde, sabedoria e força para seguir adiante. Em todos os momentos de angústia e dúvida, a oração foi meu refúgio e a espiritualidade minha sustentação. Sigo acreditando que nada é por acaso e que cada obstáculo enfrentado tem seu propósito.

À minha noiva, Iêda, com quem compartilho sonhos, planos e desafios. Sua paciência, compreensão e apoio durante os períodos mais intensos dessa caminhada foram essenciais. Obrigado por caminhar comigo, por acreditar no meu potencial e por ser meu alicerce nos momentos mais difíceis. Seu amor e incentivo me motivaram diariamente.

À minha mãe, Sidnéia, dedico um agradecimento especial. Sua força, coragem e dedicação moldaram quem sou. Você sempre acreditou em mim, mesmo quando eu duvidei. Teus conselhos, tua fé e teu amor foram meu porto seguro em todos os momentos de angústia e incerteza. Esta conquista é tanto sua quanto minha.

Aos meus avós, Asdrubal e Neuza, meus exemplos de sabedoria, ética e simplicidade. Suas palavras e ensinamentos me acompanharam desde a infância e ainda ecoam nas decisões que tomo. A presença, mesmo nas pequenas coisas, me inspira a continuar trilhando caminhos com dignidade e humildade.

Aos meus amigos, que sempre estiveram por perto, mesmo quando a distância ou a rotina acadêmica dificultavam os encontros. Obrigado pelas conversas leves, pelas risadas e, principalmente, pela escuta nos momentos de desabafo. A amizade de vocês foi uma âncora emocional valiosa durante toda a pós-graduação.

Ao meu co-orientador, Vasco Ariston, agradeço profundamente pela generosidade com que compartilhou seu conhecimento, pelas sugestões construtivas e pelo olhar atento que enriqueceram este trabalho. Sua contribuição foi essencial na consolidação desta dissertação. A combinação do seu conhecimento técnico e da sua disposição em orientar com empatia fez toda a diferença.

Ao meu orientador, Rodrigo Dias, minha mais sincera gratidão. Obrigado por sua dedicação, paciência e compromisso em me guiar ao longo desta pesquisa. Sua postura ética, rigor científico e incentivo à autonomia intelectual foram fundamentais para meu crescimento acadêmico e pessoal. Serei eternamente grato por ter aprendido tanto sob sua orientação.

Estendo meus agradecimentos às instituições de fomento à pesquisa, CAPES, CNPq e FAPEMIG, que contribuíram financeiramente para que este trabalho pudesse ser realizado. Reconheço a importância do investimento público e privado na ciência, especialmente em tempos em que a pesquisa precisa ser valorizada, defendida e sustentada. Sem esse apoio, muitos projetos como este não sairiam do papel.

A todos os professores, colegas de laboratório e da pós-graduação, agradeço pela troca de ideias, pelas parcerias e pelos aprendizados que enriqueceram minha formação. O ambiente de colaboração e acolhimento fez toda diferença na trajetória.

Finalizo com um coração cheio de gratidão. Esta etapa é apenas mais uma das muitas que virão, mas jamais será esquecida. Cada um que aqui foi citado deixou sua marca nesse processo. Muito obrigado.

“O sucesso é a soma de pequenos esforços repetidos dia após dia.”

Robert Collier

## RESUMO

Os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro, com efeitos variados como a manutenção da saúde intestinal, estimulação do sistema imunológico, equilíbrio da microbiota e prevenção de infecções. Entre os grupos mais estudados estão as bactérias lácticas, já o gênero *Pediococcus*, cuja espécie *Pediococcus acidilactici*, se destaca como promissora, porém ainda pouco explorada do ponto de vista genômico e funcional. Esta dissertação teve como objetivo avaliar o potencial probiótico da linhagem *P. acidilactici* Pa13, isolada de fezes de potro – Camaçari (BA) – e gentilmente cedida pelo Laboratório de Microbiologia Aplicada e Saúde Pública da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), por meio de análises genômicas e *in silico*. A metodologia envolveu o sequenciamento, montagem e anotação do genoma completo, bem como análises comparativas com outras linhagens públicas da mesma espécie. Foram identificados genes associados à adaptação ao trato gastrointestinal, produção de metabólitos antimicrobianos e anti-inflamatórios, presença de bacteriocinas (como pediocinas), enzimas digestivas e rotas para biossíntese de metabolitos secundários. Além disso, foram investigados genes de resistência a antibióticos e a presença de elementos genéticos que podem representar riscos à segurança clínica da linhagem. O presente estudo demonstrou, por meio de análises genômicas e comparativas *in silico*, que a linhagem *Pediococcus acidilactici* Pa13 apresenta um repertório funcional robusto e compatível com aplicações probióticas. A montagem genômica de alta qualidade permitiu identificar um conjunto diversificado de genes relacionados à adaptação intestinal produção de ácidos orgânicos e rotas de metabolização de fibras e glicanos do hospedeiro que reforça sua capacidade de adaptação ecológica em ambientes intestinais. A ausência de genes de virulência clássicos e a identificação de genes de resistência antimicrobiana intrínseca e conservada sugerem um perfil de segurança genômica aceitável para aplicações clínicas, embora análises funcionais adicionais sejam recomendadas. A estrutura aberta do pangenoma de *P. acidilactici* observada neste trabalho amplia as possibilidades de descoberta de novas linhagens com funções probióticas específicas. Este estudo fornece uma base científica sólida para pesquisas funcionais futuras e desenvolvimento de formulações probióticas mais direcionadas, especialmente voltadas à prevenção e ao tratamento de doenças inflamatórias intestinais.

**Palavras-chave:** *Pediococcus acidilactici*; Probiogenômica; Genômica comparativa; Resistência antimicrobiana; Filogenômica bacteriana.

## ABSTRACT

Probiotics are live microorganisms that, when administered in adequate quantities, confer health benefits to the host, with varied effects such as maintaining intestinal health, stimulating the immune system, balancing the microbiota, and preventing infections. Among the most studied groups are lactic acid bacteria, especially the genus *Pediococcus*, with the species *Pediococcus acidilactici* standing out as promising yet still underexplored from a genomic and functional perspective. This dissertation aimed to evaluate the probiotic potential of the strain *P. acidilactici* Pa13, isolated from horse feces in Camaçari (BA), and kindly provided by the Laboratory of Applied Microbiology and Public Health at the State University of Feira de Santana (UEFS), through genomic and *in silico* analyses. The methodology involved sequencing, assembly, and annotation of the complete genome, as well as comparative analyses with other publicly available strains of the same species. Genes associated with adaptation to the gastrointestinal tract, production of antimicrobial and anti-inflammatory metabolites, presence of bacteriocins (such as pediocins), digestive enzymes, and pathways for secondary metabolite biosynthesis were identified. Additionally, genes related to antibiotic resistance and the presence of genetic elements potentially posing clinical safety risks were investigated. This study demonstrated, through genomic and comparative *in silico* analyses, that the strain *Pediococcus acidilactici* Pa13 exhibits a robust functional repertoire compatible with probiotic applications. High-quality genomic assembly allowed the identification of a diverse set of genes related to intestinal adaptation, organic acid production, and host fiber and glycan metabolism pathways, reinforcing its ecological adaptation capacity in intestinal environments. The absence of classic virulence genes and the identification of intrinsic, conserved antimicrobial resistance genes suggest an acceptable genomic safety profile for clinical applications, although additional functional analyses are recommended. The open structure of the *P. acidilactici* pangenome observed in this study enhances the discovery possibilities of new strains with specific probiotic functions. This study provides a solid scientific foundation for future functional research and the development of more targeted probiotic formulations, especially aimed at preventing and treating inflammatory bowel diseases.

**Keywords:** *Pediococcus acidilactici*; Probiogenomics; Comparative genomics; Antimicrobial resistance; Bacterial phylogenomics.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma da Análise Probiogenômica da Linhagem <i>Pediococcus acidilactici</i> .....	30
Figura 2 - Distribuição da ancestralidade gênica da espécie <i>P. acidilactici</i> .....	33
Figura 3 - Curva de crescimento do pangenoma de <i>Pediococcus acidilactici</i> baseada no modelo de Heap .....	35
Figura 4 - Heatmap de presença e ausência gênica das linhagens de <i>Pediococcus acidilactici</i> , com árvore filogenética à esquerda .....	36
Figura 5 - Distribuição de genes preditos no segundo nível de categoria funcional pelo KEGG	36
Figura 6 - Distribuição da quantidade de genes no terceiro nível.....	37
Figura 7 - Gráfico de barras representando o número de genes associados a cada família de glicosil hidrolases (GH) identificadas no genoma de <i>P. acidilactici</i> Pa13.....	38
Figura 8 - Fluxo Metabólico de Degradação de Polissacarídeos e Formação de Metabólitos.....	39
Figura 9 - Mapa do sistema de fosfotransferase bacteriano (PTS) em <i>Pediococcus acidilactici</i> Pa13.....	40

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparativo de Abordagens em Estudos de <i>Pediococcus acidilactici</i> .....	25
Tabela 2 - Linhagens de <i>Pediococcus</i> e seus respectivos códigos de acesso.....	27
Tabela 3 - Identidade média de nucleotídeos da montagem genômica.....	32
Tabela 4 - Genes por Linhagem de <i>Pediococcus acidilactici</i> na Análise do Pangenoma .....	33

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCCs: Ácidos Graxos de Cadeia Curta

antiSMASH – Antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell

BAGEL – BActeriocin GEnome mining tooL

BLIs / BLs – Bactérias Lácticas

CARD – Comprehensive Antibiotic Resistance Database

FAO – Food and Agriculture Organization

GC – Conteúdo de Guanina + Citosina

GPRs – Receptores Acoplados à Proteína G

IL: Interleucina

IFN- $\gamma$ : Interferon-gama

KEGG – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

LCA - Last Common Ancestor

MALT: Tecido Linfoide Associado à Mucosa

MAMPs: Padrões Moleculares Associados a Microrganismos

MRS – De Man, Rogosa e Sharpe (meio de cultura)

NF-KB: Fator Nuclear Kappa B

NCBI – National Center for Biotechnology Information

ORFs – Regiões de Leitura Aberta (Open Reading Frames)

Pa13 – *Pediococcus acidilactici* linhagem 13

PHASTER – Phage Sarch Tool Enhanced Release

Quast: Quality Assessment Tool for Genome Assemblies

sIgA: Imunoglobulina A Secretória

SKESA – Strategic K-mer Extension for Scrupulous Assemblies

SPAdes – St. Petersburg genome assembler

TGI: Trato Gastrointestinal

Th1: Células T Helper 1

Th2: Células T Helper 2

Th17: Células T Helper 17

Tregs: Células T Reguladoras

TLRs: Receptores Toll-Like

TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral Alfa

UEFS: Universidade Estadual de Feira de Santana

VFDB – Virulence Factor Database

WHO: Organização Mundial da Saúde (World Health Organization)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1 Microbiota intestinal. ....	16
1.2 Probióticos. ....	17
1.3 Mecanismo de ação dos probióticos. ....	17
1.3.1 Controle de patógenos.....	18
1.3.2 Fortalecimento da barreira epitelial .....	18
1.3.3 Elicitação de respostas anti inflamatórias .....	19
1.3.3.1 Ativação do sistema imune inato .....	19
1.3.3.2 Ativação do sistema imune adaptativo .....	20
1.4 O gênero <i>Pediococcus</i> .....	21
1.5 Probiogenômica .....	22
1.5.1 O papel da probiogenômica .....	22
1.5.2 Estudos de genômica com <i>Pediococcus acidilactici</i> .....	23
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	25
2.1 Objetivo geral. ....	25
2.2 Objetivos específicos .....	25
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	26
3.1 Linhagens bacterianas. ....	26
3.1.1 Isolamento e condições de cultivo. ....	26
3.1.2 Genomas públicos.....	26
3.2 Sequenciamento, Montagem e Anotação de <i>P. acidilactici</i> Pa13 .....	28
3.3 Análises de genômica comparativa.....	28
3.3.1 Classificação taxonômica da linhagem Pa13 .....	28
3.3.2 Análises pangenômicas e evolutivas da espécie <i>P. acidilactici</i> .....	29

3.4 Identificação de mecanismos protetores. ....	30
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
4.1 Análise de qualidade das montagens de <i>P. acidilactici</i> Pa13 e dados gerais de anotação....	31
4.2 Análise de qualidade dos genomas públicos. ....	31
4.3 Análises taxonômicas de <i>P. acidilactici</i> Pa13. ....	31
4.4 Análise do Pangenoma de <i>Pediococcus acidilactici</i> .....	33
4.5 Anotação gênica e ontologia.....	36
4.6 Bacteriocinas.....	40
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>40</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>49</b>
<b>7. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>50</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>51</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Microbiota Intestinal

Uma microbiota é constituída por uma comunidade de microrganismos que vivem num ambiente específico, tal como solo, água, superfície de plantas e superfícies e cavidades de animais. No homem, a microbiota humana com maior densidade celular microbiana é a microbiota intestinal (D'Argenio e Salvatore, 2015). O Trato gastrointestinal (TGI) contém com mais de 2000 espécies de bactérias diferentes que em conjunto apresentam em torno de 5 milhões de genes (Lupp *et al.*, 2007; D'Argenio e Salvatore, 2015). A maior parte desta microbiota encontra-se essencialmente no cólon onde desempenha uma diversidade de funções interferindo na nossa fisiologia e participando em funções vitais como contribuição nutricional, imunomodulação, resistência a colonização e na fisiologia do hospedeiro (Capuco *et al.*, 2020). No entanto, uma microbiota saudável e benéfica requer um equilíbrio homeostático entre todas as espécies microbianas e o seu hospedeiro (Reddel *et al.*, 2019).

Entre as funções essenciais destaca-se a proteção contra a colonização por patógenos através da competição por espaço, nutrientes e receptores do hospedeiro (Pickard *et al.*, 2017). A microbiota também desempenha um papel vital na modulação do sistema imunológico. Os microrganismos benéficos presentes no intestino estimulam a produção de imunoglobulinas, citocinas e células dendríticas, além de equilibrar a resposta imunológica entre os linfócitos Th1, Th2 e Th17. Esta modulação é crucial para a prevenção de doenças autoimunes e alérgicas, além de fortalecer a resposta imunológica contra patógenos (Bermudez-Brito *et al.*, 2012).

A microbiota também tem um papel essencial no metabolismo de nutrientes e vitaminas. Algumas linhagens intestinais sintetizam vitaminas do complexo B e K, que são indispensáveis para diversas funções metabólicas do corpo. Além disso, essas bactérias ajudam na digestão de compostos, tais como fibras de origem vegetal como os fructanos, o que é particularmente benéfico para funções tróficas do hospedeiro (Holzapfel & Schillinger, 2002). A microbiota contribui para a redução da inflamação intestinal ao suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias e aumentar a produção de citocinas anti-inflamatórias.

A disbiose, caracteriza-se pelo desequilíbrio na composição da microbiota intestinal, e tem sido associada ao surgimento de diversas doenças crônicas, especialmente as de natureza

inflamatória, como a doença de Crohn e a retocolite ulcerativa (Ouwehand, Salminen & Isolauri, 2002). Atualmente vem sendo desenvolvidas diferentes estratégias que modulam e direcionam o desenvolvimento de uma microbiota intestinal saudável (Kundu *et al.*, 2017). A comunidade científica tem dedicado esforços consideráveis no desenvolvimento de tratamentos baseados no uso de probióticos, prebióticos, transplante de microbiota fecal e outras intervenções dietéticas, com o objetivo de restabelecer a composição saudável da microbiota e, assim, reduzir a inflamação e melhorar a saúde geral do hospedeiro (Leung *et al.*, 2016; Lloyd-Price *et al.*, 2016; Peterson *et al.*, 2020; Zhang & Li, 2014).

## 1.2 Probióticos

Os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002; Hill *et al.*, 2014). Eles podem pertencer a diferentes grupos de bactérias, assim como também de leveduras. Esses microrganismos benéficos são encontrados em alimentos fermentados, como iogurtes, kefir, chucrute e kimchi, e alguns deles naturalmente fazem parte da microbiota intestinal humana ou de outros animais. A eficácia dos probióticos pode variar dependendo da linhagem específica utilizada, pois cada linhagem tem componentes genéticos que promovem diferentes efeitos e benefícios para a saúde (Jacobsen, 1999). As bactérias lácticas (BLs) são os principais representantes dos probióticos atualmente. São microrganismos Gram-positivos, não esporulados, anaeróbios facultativos ou que crescem em microaerofilia, cujo principal produto do metabolismo fermentativo é o lactato. O grupo das BLs inclui espécies dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactocaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* e *Weissella* (Wang *et al.*, 2016).

## 1.3 Mecanismo de ação dos Probióticos

Dentre os efeitos provocados por esses microrganismos destacam-se a capacidade de manutenção da homeostase intestinal (Shi *et al.*, 2017), bem como o estímulo à imunidade inata e adaptativa do hospedeiro (Kaci *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2015). Neste contexto, podem atuar na inibição à colonização por patógenos gastrointestinais, e reforçar as barreiras naturais do hospedeiro, incluindo a microbiota intestinal (Blackwood *et al.*, 2017). Também é relatada a

produção de metabólitos que auxiliam no tratamento e prevenção de inflamações gastrointestinais e câncer colorretal (Oliveira *et al.*, 2007).

### **1.3.1 Controle de patógenos**

O entendimento dos mecanismos de ação dos probióticos é crucial para apreciar seu papel na promoção da saúde e prevenção de doenças. Um dos principais mecanismos é a modulação da microbiota intestinal. Os probióticos competem com patógenos por nutrientes e locais de adesão nas mucosas intestinais, promovendo um equilíbrio saudável da microbiota. Esta ação competitiva é essencial para manter a homeostase do ecossistema intestinal e prevenir a colonização por microrganismos prejudiciais (Holzapfel & Schillinger, 2002).

Nesse contexto, muitos probióticos produzem substâncias antimicrobianas, como bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio, que inibem o crescimento de patógenos. Estas substâncias criam um ambiente desfavorável para microrganismos nocivos, ajudando a proteger o hospedeiro contra infecções intestinais. Essa produção de compostos antimicrobianos é uma característica importante que confere aos probióticos um papel protetor significativo no TGI (Gareau, Sherman & Walker, 2010).

### **1.3.2 Fortalecimento da barreira epitelial**

Um dos principais mecanismos pelos quais os probióticos exercem esse efeito é pela indução da produção de muco pelas células caliciformes. Este muco é composto por mucinas, como MUC1 e MUC2, que formam uma camada protetora sobre a superfície das células epiteliais. Essa camada de muco impede a aderência de patógenos e toxinas às células intestinais, protegendo a mucosa intestinal contra infecções e danos (Furlan, 2010).

Além de estimular a produção de mucinas, os probióticos também influenciam a expressão de proteínas envolvidas na formação e manutenção do citoesqueleto e das junções firmes (tight junctions) das células epiteliais. As junções firmes são estruturas cruciais que mantêm a integridade da barreira intestinal, impedindo a passagem não controlada de substâncias e microrganismos do lúmen intestinal para a corrente sanguínea. Proteínas como zonulinas e ocludinas são componentes-chave dessas junções, e os probióticos podem aumentar sua expressão, fortalecendo a barreira

epitelial e prevenindo a permeabilidade intestinal aumentada, que está associada a várias doenças inflamatórias intestinais (Gareau, Sherman & Walker, 2010).

Os probióticos também estimulam a produção de defensinas pelas células de Paneth, que são células especializadas localizadas nas criptas do intestino delgado. As defensinas são peptídeos antimicrobianos que desempenham um papel crítico na defesa imunológica inata do intestino. Elas possuem a capacidade de desestabilizar a membrana de uma ampla gama de patógenos, incluindo bactérias, fungos e vírus, contribuindo significativamente para a proteção contra infecções intestinais. A estimulação da produção de defensinas pelos probióticos reforça ainda mais a capacidade do intestino de se defender contra invasores patogênicos (Sanders, 2008).

### **1.3.3 Elicitação de respostas anti inflamatórias**

#### **1.3.3.1 Ativação do sistema imune inato**

Os probióticos têm um papel fundamental na modulação das respostas imunes locais no intestino, mediadas por componentes bacterianos conhecidos como Padrões Moleculares Associados a Microrganismos (MAMPs) e metabólitos produzidos durante a fermentação, como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs). Os MAMPs, que incluem lipopolissacarídeos, peptidoglicanos e flagelina, são reconhecidos pelos receptores do hospedeiro, como os Receptores Toll-Like (TLRs) e os receptores NOD (Nucleotide-binding Oligomerization Domain). A interação dos MAMPs com esses receptores é crucial para a ativação das respostas imunes inatas e a manutenção da homeostase intestinal (Lebeer *et al.*, 2010).

Os AGCCs, como butirato, acetato e propionato, normalmente são produzidos pela fermentação de fibras dietéticas pela microbiota autóctone do intestino, porém este processo pode ser intensificado pelo uso de probióticos. Esses metabólicos exercem vários efeitos benéficos no sistema imunológico intestinal. O butirato, por exemplo, é uma fonte de energia essencial para as células epiteliais do cólon e desempenha um papel importante na manutenção da integridade da barreira intestinal. Além disso, os AGCCs podem interagir com receptores acoplados a proteínas G (GPRs), como GPR41 e GPR43, regulando respostas inflamatórias e protetoras no intestino (Koh *et al.*, 2016). A ativação de GPR43, por exemplo, pode promover a produção de citocinas anti-inflamatórias e a indução de células T reguladoras, que são essenciais para a modulação da

inflamação e a prevenção de doenças autoimunes. Além disso, os AGCCs são conhecidos por inibir a via de sinalização do fator nuclear kappa B (NF-KB), uma via central na resposta inflamatória. As citocinas pró-inflamatórias ativadas pela via NF-KB incluem IL-1 $\beta$  (interleucina-1 beta), IL-6 (interleucina-6), TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa), IL-12 (interleucina-12), e IL-23 (interleucina-23). A inibição da via NF-KB leva à redução na produção dessas citocinas, promovendo assim um ambiente intestinal mais equilibrado e menos inflamatório (Vinolo *et al.*, 2011).

Os probióticos também podem influenciar a ativação do inflamassoma, um complexo proteico envolvido na resposta imune inata. A ativação excessiva do inflamassoma está associada a inflamações crônicas e doenças autoimunes. Metabólitos bacterianos podem modular essa ativação, promovendo a produção de moléculas anti-inflamatórias e reduzindo a secreção de IL-1 $\beta$ , uma citocina pró-inflamatória chave. Esse efeito é benéfico na manutenção da homeostase intestinal e na prevenção de inflamações excessivas (Macia *et al.*, 2015).

### **1.3.3.2 Ativação do sistema imune adaptativo**

Os probióticos desempenham um papel fundamental na modulação da resposta imune adaptativa no intestino, especialmente na estimulação de citocinas com papéis chave na ativação de mecanismos anti-inflamatórios. Entre essas citocinas, a interleucina-10 (IL-10) se destaca por sua capacidade de regular a inflamação e manter a homeostase imunológica. A IL-10 é produzida por diversas células do sistema imunológico, incluindo células T reguladoras (Tregs), macrófagos e células dendríticas. Esta citocina exerce um efeito anti-inflamatório crucial, suprimindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ , além de inibir a ativação de células efetoras pró-inflamatórias (Th1, Th2 e Th17) (Saraiva & O'Garra, 2010).

Além de suas funções anti-inflamatórias da resposta celular, a IL-10 também está envolvida na regulação da produção e secreção de imunoglobulina A secretória (sIgA) nas superfícies mucosas. A sIgA é a principal imunoglobulina presente nas mucosas e desempenha um papel vital na defesa contra patógenos ao neutralizar toxinas e impedir a adesão e invasão de microrganismos nas células epiteliais. A produção de sIgA é estimulada por células B no tecido linfóide associado à mucosa (MALT), e a presença de IL-10 é essencial para a diferenciação dessas células B em células plasmáticas produtoras de IgA (Mantis *et al.*, 2011).

Os probióticos também influenciam a resposta imune intestinal ao estimular a produção de IL-10 pelas células dendríticas e Tregs. Essa interação promove um ambiente anti-inflamatório no intestino, essencial para a prevenção de doenças inflamatórias intestinais e outras condições autoimunes. Além disso, a IL-10 contribui para a manutenção da tolerância imunológica, prevenindo respostas imunes exageradas que poderiam levar a danos teciduais (O'Mahony *et al.*, 2008).

Outro aspecto importante da modulação imunológica pelos probióticos é a inibição das respostas efetoras pró-inflamatórias mediadas pelas células T helper (Th1, Th2 e Th17). As células Th1 são responsáveis pela produção de citocinas como o interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), que ativa macrófagos e promove a inflamação. As células Th2 produzem citocinas como a IL-4, IL-5 e IL-13, que estão associadas a respostas alérgicas e à inflamação eosinofílica. As células Th17, por sua vez, produzem IL-17, uma citocina que recruta neutrófilos e está envolvida em várias doenças autoimunes. Os probióticos, ao promoverem a produção de IL-10, ajudam a equilibrar essas respostas efetoras, reduzindo a inflamação e promovendo a saúde intestinal (Scholz *et al.*, 2011).

#### 1.4 O gênero *Pediococcus*

Dentre as BLs, o uso do gênero *Pediococcus* como probiótico tem sido menos estudado. Contudo, o crescente interesse pela elucidação de propriedades probióticas têm impulsionado mais pesquisas envolvendo este grupo. As espécies mais comuns desse gênero e que podem ser encontradas no TGI humano são *P. acidilactici* e *P. pentosaceus* (Papagianni & Anastasiadou, 2009). O gênero *Pediococcus* pertence à família Lactobacillaceae, dentro da ordem Lactobacillales, classe Bacilli e filo Firmicutes. Este gênero é composto por bactérias Gram-positivas, caracterizadas pela ausência de esporos e pela sua forma cocoide (Garvie, 1986). O metabolismo do *Pediococcus* é predominantemente anaeróbico facultativo, o que significa que pode realizar metabolismo fermentativo na ausência de oxigênio, mas também pode utilizar oxigênio quando presente. A fermentação realizada por *Pediococcus* é heterolática e os principais metabólitos finais da fermentação incluem ácido lático, acetato, álcool etílico e dióxido de carbono (Hammes & Hertel, 2009).

O habitat natural de *Pediococcus* inclui uma ampla gama de ambientes, sendo encontrado principalmente em plantas, produtos fermentados e no TGI de mamíferos. Espécies de *Pediococcus*

são comumente isoladas de alimentos fermentados, como vegetais em conserva, laticínios, carnes curadas e produtos de cereais. Este gênero desempenha um papel importante na fermentação de alimentos, contribuindo para a preservação e desenvolvimento de sabores específicos (Di Cagno *et al.*, 2013).

Os nichos ecológicos de *Pediococcus* são bastante diversos. No contexto da fermentação de alimentos, estas bactérias são importantes como culturas iniciadoras, ajudando a estabelecer um ambiente microbiológico estável e suprimindo o crescimento de patógenos e outros organismos indesejáveis. Em produtos lácteos fermentados, como queijos e iogurtes, as espécies de *Pediococcus* contribuem para o desenvolvimento de textura e sabor. Além disso, no ambiente gastrointestinal, elas podem atuar como probióticos, promovendo a saúde digestiva e a imunidade do hospedeiro (Ouwehand *et al.*, 2002).

## **1.5 Probiogenômica**

### **1.5.1 O Papel da Probiogenômica**

A probiogenômica é um campo emergente que combina princípios da genômica e da biologia dos probióticos para estudar a diversidade genética, a função e a interação desses microrganismos com seus hospedeiros. Este campo multidisciplinar utiliza abordagens genômicas, transcriptômicas, proteômicas e metabolômicas para entender melhor os mecanismos de ação dos probióticos, sua influência na saúde humana e animal, e seu potencial para aplicações terapêuticas. A probiogenômica oferece *insights* valiosos sobre como os probióticos interagem com o hospedeiro, colonizam o TGI e modulam a resposta imunológica (Ventura, Turrone & van Sinderen, 2012).

A abordagem probiogenômica permite a análise sistemática dos genomas dos probióticos para identificar genes envolvidos em funções específicas, como adesão a células epiteliais, metabolismo de nutrientes, produção de metabólitos bioativos e resistência a condições adversas. Essa análise genômica revela informações importantes sobre a diversidade genética intraespecífica e interespecífica dos probióticos, bem como sobre sua evolução e adaptação a diferentes ambientes. Além disso, a comparação entre genomas de linhagens probióticas permite a identificação de

marcadores genéticos associados a características de interesse, como potencial probiótico e segurança (Ventura, Turróni & van Sinderen, 2012).

Esta abordagem também desempenha um papel na otimização de formulações simbióticas existentes. Ao identificar genes e vias metabólicas envolvidos em atividades probióticas desejáveis, os cientistas podem projetar combinações de nutrientes e linhagens probióticas com características específicas, promovendo assim maior capacidade de adesão, resistência ao ácido gástrico e produção de metabólitos bioativos. Além disso, a análise genômica de probióticos permite a detecção de genes de virulência e resistência a antibióticos, facilitando a seleção de linhagens seguras para uso em humanos e animais (Plaza-Díaz *et al.*, 2019).

### **1.5.2 Estudos de genômica com *Pediococcus acidilactici***

Existem poucos estudos *in silico* envolvendo o uso de abordagens genômicas na espécie *P. acidilactici*. Algumas linhagens tiveram suas propriedades de interesse farmacêutico e industrial descobertas por meio de estudos *in vitro*, tais como resistência ao baixo pH, ao aquecimento, tratamentos proteolíticos e produção de peptídeos antimicrobianos, especialmente de bacteriocinas ou, mais especificamente, de pediocinas (Papagianni e Anastasidou, 2009, Skariyachan *et al.*, 2019). Nieto-Lozano e colaboradores (2010) relataram forte atividade da pediocina de *P. acidilactici* MCH14 contra *Listeria monocytogenes* e *Clostridium perfringens* em carnes e salsichas. Estudos avaliando a biopreservação em alimentos por esta linhagem são vastos, principalmente em peixes e outros animais marinhos (Cosansu *et al.*, 2010), vinhos (Díez *et al.*, 2012) e derivados lácteos (Skariyachan *et al.*, 2019).

Quanto a sua aplicação clínica, esta espécie tem sido investigada em modelos animais no controle de infecções por *L. monocytogenes* e tem demonstrado potencial como probiótico em modelo de infecção vaginal (Borges *et al.*, 2016). Um outro estudo também observou efeitos protetores da linhagem *P. acidilactici* R037 no tratamento de encefalomielite autoimune ou através da indução de células T produtoras de IL10, sendo um potencial terapêutico para a referida doença (Takata *et al.*, 2011).

Em um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, Coelho-Rocha *et al.* (2020) isolaram e analisaram as propriedades probióticas da cepa Pa13 de *P. acidilactici*. Essa cepa foi isolada de

fezes de potro em Camaçari (BA) e cedida pelo Laboratório de Microbiologia Aplicada e Saúde Pública da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). Entre os principais resultados, foi observado que esta linhagem apresenta resistência a acidez e sais biliares, sugerindo estar bem adaptada às condições do TGI humano. Além disso foi notado a capacidade de inibir diversos patógenos como *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *L. monocitogenes*, *Salmonella tiphymurium* e *Enterococcus faecalis*.

Entretanto, mesmo que estes resultados sugiram papéis importantes na homeostase intestinal, muito pouco se sabe sobre os mecanismos de ação e bases moleculares de *P. acidilactici* Pa13. Nas últimas décadas, o advento de métodos de sequenciamento de alto rendimento e abordagens de genômica comparativa tem contribuído significativamente na busca por características probióticas específicas de cada linhagem, tais como identificação de genes codificadores de bacteriocinas, adesinas, enzimas envolvidas na produção de compostos metabólitos com efeito anti-inflamatório e vitaminas (Ventura, Turroni & van Sinderen, 2012).

Além disso, no estudo de Coelho-Rocha e colaboradores (2020) também demonstrou, em ensaios de antibiograma, resistência a diversas classes de antibióticos, incluindo gentamicina, estreptomicina e tetraciclina. Contudo, não se sabe se tais características são intrínsecas ou associadas a elementos transponíveis, plasmídios e fagos. A presença e associação destes elementos móveis com os genes de resistência precisa ser investigada para definir o grau de segurança quanto ao uso clínico, isto é, sua capacidade de gerar risco de aquisição ou disseminação de fatores de resistência para outras bactérias da microbiota intestinal ou do ambiente.

Neste contexto, o presente projeto tem como proposta caracterizar o genoma de *P. acidilactici* Pa13 através de métodos de genômica comparativa na busca por compreender as bases moleculares envolvidas na adaptação do microrganismo no trato gastrointestinal, em mecanismos protetores, assim como também possíveis fatores de risco à saúde do hospedeiro.

Este trabalho busca investigar os principais genes, vias e mecanismos moleculares em uma nova linhagem isolada no Brasil da espécie *P. acidilactici*, que possam estar envolvidos com o seu potencial probiótico e imunomodulador. A conclusão deste estudo poderá fornecer dados de maneira compreensiva através de abordagens ômicas para direcionar futuros estudos na pesquisa

clínica, com o intuito de desenvolver terapias mais eficazes para o tratamento da inflamação intestinal.

**Tabela 1: Comparativo de Abordagens em Estudos de *Pediococcus acidilactici***

<b>Característica</b>	<b>Estudos Anteriores (<i>In Vitro</i>)</b>	<b>Presente Estudo (<i>In Silico</i>)</b>
<b>Foco principal</b>	Caracterização de propriedades probióticas em laboratório (resistência, produção de metabólitos, inibição de patógenos).	Análise genômica e comparativa para identificar os genes e mecanismos moleculares por trás das propriedades probióticas.
<b>Metodologia</b>	Ensaio de cultivo celular, antibiogramas, testes de resistência ao pH e sais biliares, co-culturas.	Análise do genoma completo, montagem genômica, anotação de genes, pangenoma e filogenômica comparativa com outras 30 linhagens
<b>Contribuição</b>	Evidências funcionais da capacidade probiótica da cepa Pa13, como a degradação de mucina e a inibição de patógenos.	Revelação da base genômica dessas propriedades, com a identificação detalhada de genes de glicosil hidrolases (GHs), sistemas de transporte de membrana (PTS) e rotas metabólicas.
<b>Segurança</b>	Resistência a antibióticos observada em antibiograma, mas sem a base molecular de sua origem.	Análise da segurança genômica para distinguir resistência intrínseca de genes transferíveis, avaliando genes de resistência e elementos móveis.
<b>Nível de Exploração</b>	Fenotípico e funcional.	Genômico, evolutivo e molecular.

## 2. OBJETIVO

### 2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é avaliar o potencial probiótico de *Pediococcus acidilactici* Pa13, através de estudo genômico.

### 2.2 Objetivos específicos

Montar e anotar o genoma completo de *P. acidilactici* Pa13.

Realizar análises *in silico* no genoma de *P. acidilactici* Pa13 para predição de produtos gênicos envolvidos na adaptação ao trato gastrointestinal.

Realizar análises *in silico* no genoma de *P. acidilactici* Pa13 para predição de produtos gênicos e metabólitos envolvidos em mecanismos de proteção antimicrobianos e anti-inflamatórios.

Realizar análises *in silico* no genoma de *P. acidilactici* Pa13 para detecção de genes de resistência a antibióticos e elementos móveis como fatores de risco relacionados ao uso clínico da linhagem.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 Linhagens bacterianas**

##### **3.1.1 Isolamento e condições de cultivo**

A amostra de cultura bacteriana da linhagem de *P. acidilactici* Pa13 foi isolada de fezes de potro e gentilmente cedida pelo Laboratório de Microbiologia Aplicada e Saúde Pública da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). A linhagem foi mantida estocada em meio MRS (de Man, Ragosa & Sharpe) com glicerol 15% a -80°C. Para a ativação da cultura, foi preparado um inóculo em caldo MRS (Difco™) incubado overnight em estufa bacteriológica a 37°C. Quando necessário a cultura reativada foi semeada em placa de Petri com MRS (Difco™) acrescido de 1,5% de ágar bacteriológico (Difco™). A taxonomia da linhagem Pa13 foi identificada por Coelho-Rocha (2020) pelo método de espectrometria de massa com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e análise de tempo-de-vôo (MALDI-TOF).

##### **3.1.2 Genomas públicos**

Para as análises de genômica comparativa os genomas de 30 linhagens da espécie *P. acidilactici* foram obtidos do banco de dados GENBANK do repositório público NCBI acessado no dia 06/11/2024. Foram avaliadas montagens genômicas de genomas públicos de *Pediococcus* ssp utilizando o CheckM. As métricas de qualidade incluíram a completude do genoma e o índice

de contaminação. As linhagens com melhor desempenho foram identificadas com base em uma completude de 100% e um índice de contaminação inferior a 0,4.

**Tabela 2: Linhagens de *Pediococcus* e seus respectivos códigos de acesso**

<b>Código de acesso (GENBANK)</b>	<b>Linhagem*</b>	<b>Ano</b>	<b>País de origem</b>	<b>Completude (%)</b>	<b>Contaminação (%)</b>
CP033438.1	ATCC8042	2019	Coreia do Sul	99.98%	0.72%
CP096571.1	BB2-4M	2022	Coreia do Sul	99.99%	0.73%
CP018763.1	BCC1	2016	China	100%	0.55%
CP048019.1	CACC537	2020	Coreia do Sul	99.99%	0.82%
CP118923.1	CLP03	2023	China	100%	0.36%
CP066046.1	FDAARGOS_1007	2020	Estados Unidos	99.99%	0.55%
CP066066.1	FDAARGOS_1008	2020	Estados Unidos	99.98%	0.72%
CP068106.1	FDAARGOS_1133	2021	Estados Unidos	99.98%	0.32%
CP118436.1	GLP06	2023	China	100%	0.36%
CP061715.1	HN9	2020	Tailândia	100%	0.61%
CP023654.1	JQII-5	2019	China	99.98%	1.16%
CP126697.1	KFRI_F1493	2023	Coreia do Sul	100%	0.95%
CP083725.1	MT25	2021	China	99.94%	0.33%
CP025471.1	PB22	2018	Coreia do Sul	99.99%	0.33%
CP080397.1	PMC202	2021	Coreia do Sul	99.99%	0.64%
CP050079.1	PMC48	2020	Coreia do Sul	99.98%	1.77%
CP053421.1	PMC65	2020	Coreia do Sul	99.99%	0.64%
CP021487.1	SRCM100313	2017	Coreia do Sul	99.99%	1.2%
CP021484.1	SRCM100424	2017	Coreia do Sul	100%	0.35%
CP021529.1	SRCM101189	2017	Coreia do Sul	100%	0.37%
CP117486.1	SRCM102024	2023	Coreia do Sul	100%	0.36%
CP028247.1	SRCM102731	2020	Coreia do Sul	100%	0.5%
CP028249.1	SRCM102732	2020	Coreia do Sul	100%	0.32%

CP035151.1	SRCM103367	2019	Coreia do Sul	99.9%	0.0%
CP035154.1	SRCM103387	2019	Coreia do Sul	99.99%	0.49%
CP035266.1	SRCM103444	2019	Coreia do Sul	99.99%	0.38%
CP103908.1	SRCM210477	2022	Coreia do Sul	99.96%	0.38%
CP015206.1	ZPA017	2016	China	99.98%	0.58%
CP082111.1	ZY271	2021	China	99.17%	0.0%
CP067392.1	pll	2021	China	99.98%	0.29%
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ATCC 33316	2017	Coreia do Sul	99.59%	-

\*Todas as linhagens são *Pediococcus acidilactici*, exceto a *P. pentosaceus*, utilizada como grupo externo

### 3.2 Sequenciamento, Montagem e Anotação de *P. acidilactici* Pa13

A extração do DNA genômico foi realizada seguindo as recomendações do protocolo do kit de purificação de DNA genômico Wizard (Promega). As amostras de DNA foram usadas para preparar bibliotecas *shotgun* de genoma completo realizadas com o kit de preparação de amostra de DNA Illumina TruSeq. Bibliotecas de DNA genômico foram sequenciadas usando a plataforma HiSeq 2500 (Illumina) com leituras de extremidades pareadas ( $2 \times 150$  pb) com um tamanho de inserto de 450 pb.

A qualidade dos dados brutos de leitura foi avaliada utilizando as ferramentas FastQC v0.11.9. A filtragem de leituras de baixa qualidade foi realizada através da ferramenta Trimmomatic v 0.39. As montagens foram realizadas utilizando os softwares SPAdes v4.00, SKESAv2.4.0 e Unicycler v0.5.1. As montagens geradas foram avaliadas pela ferramenta Quast v5.3.0 (Quality Assessment Tool for Genome Assemblies; Bankevich *et al.*, 2012; Suvorov; Agarwala; Lipman, 2018; Wick *et al.*, 2017) e CheckM2. O resultado dessa fase foi submetido a plataformas de predição gênica Prokka (Seemann, 2014).

### 3.3 Análises de genômica comparativa

#### 3.3.1 Classificação taxonômica da linhagem Pa13

A análise de Identidade Nucleotídica Média (ANI) foi realizada para confirmar a espécie da linhagem Pa13, utilizando a ferramenta JSpecies. A similaridade entre genomas foi investigada através de alinhamento local entre locis gênicos homólogos, sendo considerado da mesma espécie valores de ANI acima de 95%. O genoma da linhagem Pa13 foi comparado com o genoma de referência da espécie, *P. acidilactici* SRM100320. Como controle, foi utilizado um genoma da espécie *P. pentosaceus* ATCC 33316.

### 3.3.2 Análises pangenômicas e evolutivas da espécie *P. acidilactici*

O pangenoma da espécie *P. acidilactici* foi estimado com base no número total de genes não redundantes das 30 linhagens obtidas no NCBI e a linhagem Pa13 sequenciada neste trabalho. Foi utilizada a ferramenta Roary v. 3.13.0 para construir a matriz de presença e ausência de genes. A detecção dos genes foi realizada por BLASTp considerando 70% de identidade entre sequências de aminoácidos das diferentes linhagens. A curva do pangenoma (Heap law), foi estimada com auxílio do Rstudio (pacotes: dplyr, tidyr, ggplot2, readr, minpack.lm, scales) com base na lei de Heap que contempla a seguinte fórmula:

$$P(n) = \kappa \cdot n^\alpha$$

Onde,  $P(n)$  é número total de genes no pangenoma após adicionar  $n$  genomas;  $\kappa$  é a constante de escala e  $\alpha$ , expoente de crescimento.

Com base no valor de  $\alpha$  estimado, o pangenoma da espécie foi considerado aberto ( $\alpha < 1$ ) ou fechado ( $\alpha > 1$ ). Adicionalmente, foi estimado o tamanho do genoma central e acessório, também sendo identificado os genes únicos da linhagem Pa13.

Para se investigar aspectos de capacidade adaptativa, foi realizada uma inferência taxonômica dos genes da espécie *Pediococcus acidilactici* estimando-se o LCA (ancestral comum mais recente) para identificar a origem evolutiva de cada gene. A análise foi realizada com apoio da ferramenta Taxallnomy v1.7.1. O proteoma de referência da espécie (DSM 20284) foi obtido do repositório do UniProt, contendo um total de 1.884 sequências de aminoácidos completas. Paralelo a isso, todos os demais proteomas de referência de bactérias disponíveis nessa mesma divisão foram igualmente recuperados, totalizando 9.329 organismos e aproximadamente 125.978.910 sequências de proteínas. Para análises comparativas, foi construída uma base de dados com esses

proteomas bacterianos utilizando a ferramenta DIAMOND (versão 2.1.12), aplicando a funcionalidade de codificação taxonômica via flag `--taxonmap`, excluindo-se o proteoma de *P. acidilactici* da formatação. O proteoma desta espécie (query) foi então alinhado contra a base em uma busca do tipo BLASTp, com o parâmetro `--top 10`, que restringe os resultados às sequências cujo score seja igual ou superior a 90% do melhor alinhamento (best hit). Para inferência taxonômica, foi escolhida a opção de saída `-f 102`, que retorna, para cada alinhamento, o LCA entre os hits de cada consulta. Os resultados do alinhamento foram importados para um banco de dados relacional local MariaDB.

### 3.4 Identificação de mecanismos probióticos

Genes envolvidos no metabolismo de carboidrato da linhagem Pa13 foi investigado com auxílio das ferramentas iLABdb (An Integrated Lactic Acid Bacteria Database) para reconstrução de vias metabólicas, incluindo enzimas envolvidas na degradação de polissacarídeos de diferentes origens. As famílias das glicosídeo hidrolases (GHs) foram identificadas com auxílio da ferramenta CAZy (Carbohydrate-Active enZYmes Database) e a produção de metabólitos primários e secundários como Ácidos graxos de cadeia curta. Genes codificadores de bacteriocinas foram preditos usando o software BAGEL4 (Van Heel *et al.*, 2018) e o antiSMASH (BLIN *et al.*, 2023).



**Figura 1. Fluxograma da Análise Probiogenômica da Linhagem *Pediococcus acidilactici* Pa13.** Diagrama representando o fluxo de trabalho e as ferramentas utilizadas para a caracterização genômica da linhagem.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Análise de qualidade das montagens de *P. acidilactici* Pa13 e dados gerais de anotação

A análise das montagens genômicas com SPAdes, SKESA e Unicycler revelaram resultados bastante semelhantes em várias métricas avaliadas. Ambas as ferramentas produziram um número comparável de contigs, com SPAdes gerando 20 contigs e SKESA gerando 19 contigs. O tamanho total do comprimento das montagens foi ligeiramente maior no SPAdes (2.157.767 bp) em comparação com SKESA (2.145.879 bp). Embora essa diferença seja pequena, ela indica que a montagem com SPAdes pode ter capturado um pouco mais de sequência genômica ou preenchido algumas lacunas em relação à montagem com SKESA. As métricas de N50 e L50 foram quase idênticas para ambas as ferramentas, com SPAdes apresentando um N50 de 352.769 bp e um L50 de 3, enquanto SKESA teve um N50 de 352.816 bp e um L50 de 3. O conteúdo GC foi também muito próximo, com SPAdes apresentando 42,08% e SKESA apresentando 42,1%. Portanto, a montagem selecionada para as análises de probiogenômica deste trabalho foi a do SPAdes. Segundo a anotação realizada na ferramenta Prokka, a linhagem Pa13 apresentou 2114 CDS, 55 tRNAs e 6 genes ribossomais.

### 4.2 Análise de qualidade dos genomas públicos

Entre as linhagens de *P. acidilactici* avaliadas, as que apresentaram melhor montagem em termos de qualidade foram SRCM102732, SRCM100424 e CLP03. Essas linhagens apresentaram uma qualidade de 100% de completude. Além disso, os índices de contaminação foram extremamente baixos, com valores de 0,32, 0,35 e 0,36, respectivamente. Entretanto, todos os 30 genomas apresentaram qualidade satisfatória para prosseguir para as análises de genômica comparativa deste estudo (Tabela 2).

### 4.3 Análises taxonômicas de *P. acidilactici* Pa13

Os resultados da ANI entre a linhagem Pa13 e dois genomas de referência, *Pediococcus pentosaceus* ATCC 33316 e *Pediococcus acidilactici* SRCM100320 podem ser visualizados na tabela 3. Neste caso, a montagem selecionada para a linhagem Pa13 apresentou 98,52% de

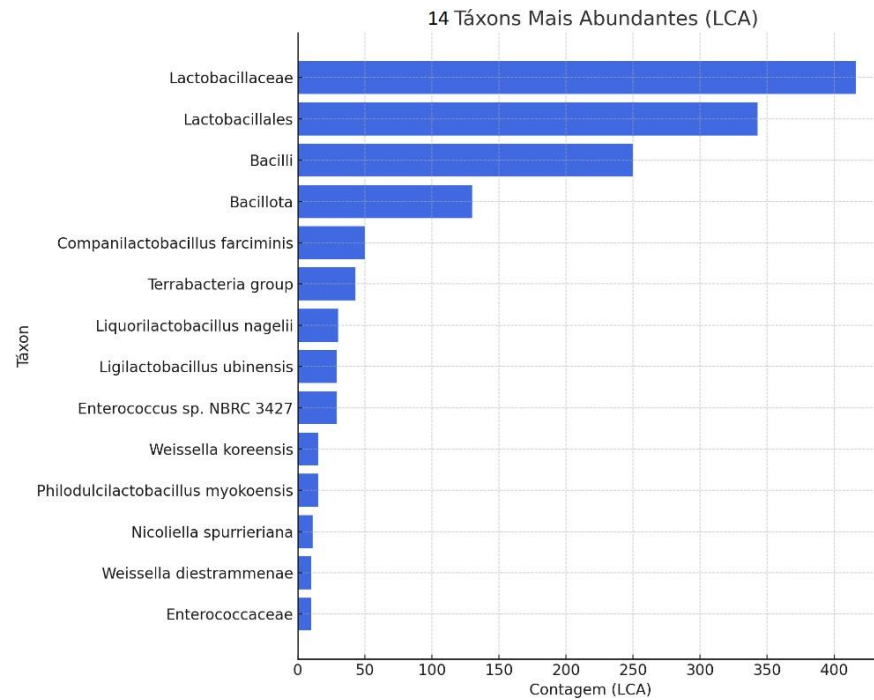
similaridade com *Pediococcus acidilactici* SRCM100320, enquanto a similaridade com *Pediococcus pentosaceus* ATCC 33316 foi consideravelmente menor (74.23%).

**Tabela 3 – Identidade média de nucleotídeos da montagem genômica.**

Linhagens	Similaridade com Linhagem Pa13 (%) – ANI*
<i>Pediococcus acidilactici</i> SRCM100320	98.52
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 33316	74.23

\*O índice ANI compara a similaridade de nucleotídeos entre os genomas, onde um valor acima de 95% indica uma forte correspondência genômica.

A análise taxonômica baseada em LCA dos genes da espécie *P. acidilactici* ilustrada na figura 2, revelou que os táxons mais frequentemente associados a origem evolutiva dos genes pertencem majoritariamente à ordem *Lactobacillales*, com destaque para a família *Lactobacillaceae* (> 400 genes), seguida de *Lactobacillales*, *Bacilli* e o filo *Bacillota* como esperado. Contudo Táxons específicos, como *Companilactobacillus farciminis* e *Liquorilactobacillus nagelii*, também foram detectados, além de outras espécies fermentativas como *Enterococcus sp.*, *Weissella koreensis* e *Philodulcिलactobacillus myokoensis* contribuindo cada um com cerca de 10 à 30 genes, sugerindo ocorrência de transferência horizontal.



**Figura 2. Distribuição da ancestralidade gênica da espécie *P. acidilactici*.** Os táxons estão organizados por contagem decrescente, com destaque para a família *Lactobacillaceae*.

#### 4.4 Análise do Pangenoma de *Pediococcus acidilactici*

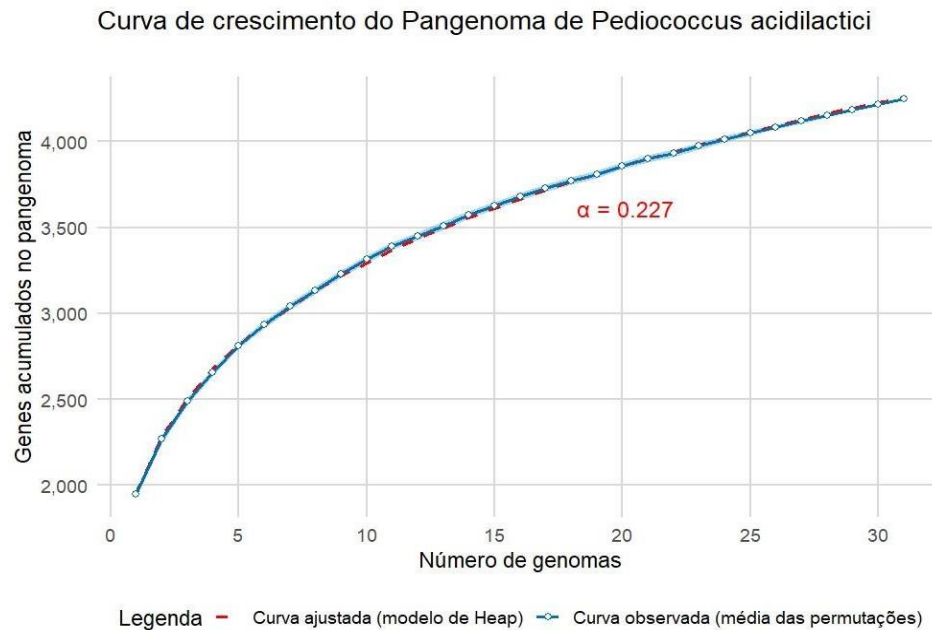
O tamanho do pangenoma total estimado da espécie *P. acidilactici* foi de 4246 genes não redundantes, o genoma central, 1216 e acessório, 3030. A quantidade de genes exclusivos de cada linhagem encontra-se na tabela 4.

**Tabela 4 – Genes por Linhagem de *Pediococcus acidilactici* na Análise do Pangenoma.**

Unique	Genes
ATCC8042	0
BB2-4M	47
BCC1	124
CACC537	32
CLP03	0
FDAARGOS_1007	18
FDAARGOS_1008	2
FDAARGOS_1133	1
GLP06	0

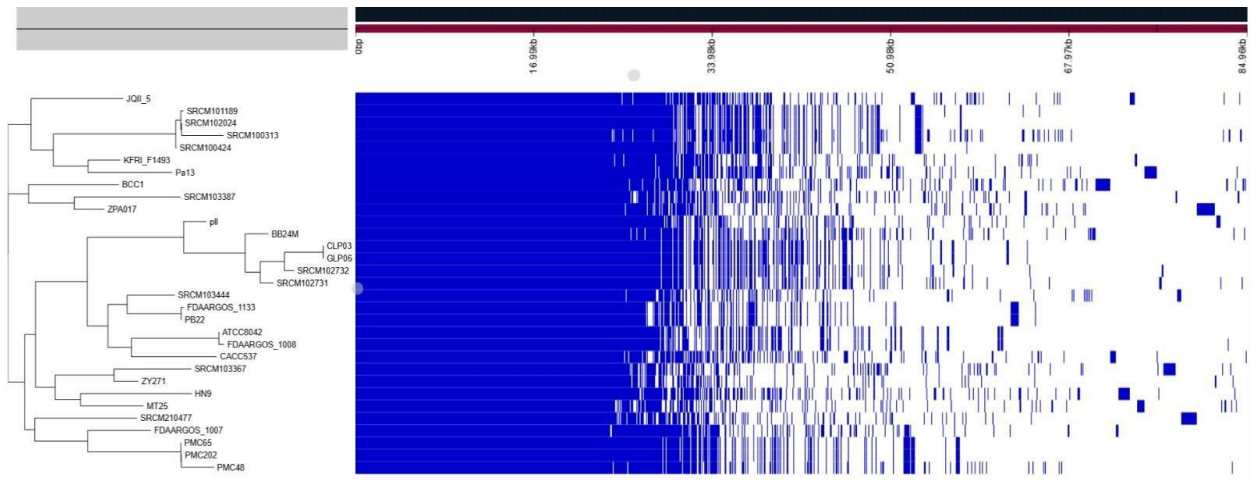
HN9	85
JQII-5	35
KFRI_F1493	15
MT25	68
PB22	0
PMC202	0
PMC48	26
PMC65	0
Pa13	77
SRCM100313	49
SRCM100424	0
SRCM101189	0
SRCM102024	00
SRCM102731	22
SRCM102732	9
SRCM103367	85
SRCM103387	14
SRCM103444	32
SRCM210477	86
ZPA017	114
ZY271	19
pll	24

A curva de crescimento do pangenoma de representa na figura 3, mostra um aumento contínuo no número de genes acumulados à medida que mais genomas são adicionados à análise. O valor de  $\alpha = 0,227$ , obtido pelo modelo de Heap, indica que o pangenoma da espécie é do tipo aberto.



**Figura 3. Curva de crescimento do pangenoma de *Pediococcus acidilactici* baseada no modelo de Heap.** A curva de Heap demonstra o crescimento do número total de genes com a inclusão progressiva de novas linhagens, refletindo a estrutura aberta do pangenoma de *P. acidilactici*.

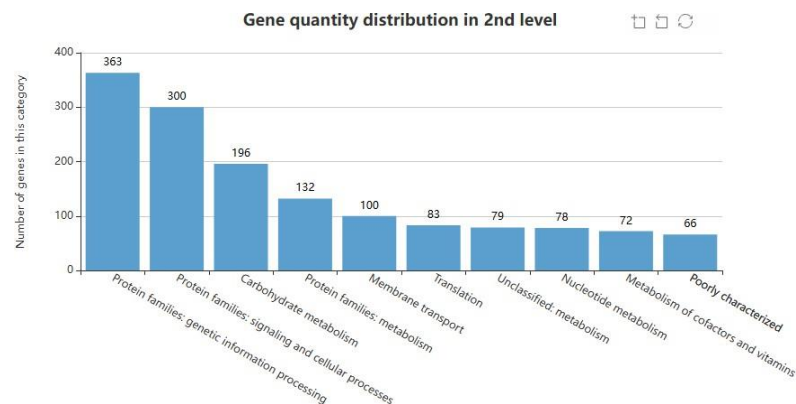
A análise da matriz de presença/ausência gênica representado pela figura 4, mostrou que a Pa13 compartilha alta similaridade gênica com SRCM100424 e SRCM102024, formando um subgrupo coeso. A linhagem KFRI\_F1493, embora próxima, aparece como um ramo lateral anterior, sugerindo uma proximidade ancestral com a Pa13. Em relação aos genes exclusivos da Pa13, 71 são proteínas hipotéticas, 2 genes de transposases e 2 enzimas de metabolismo de carboidrato. Um alinhamento por BLASTp contra o banco de dados do UniProt revelou altos índices de similaridade (>98,5%) contra genes homólogos da espécie *Liquorilactobacillus nagelii* e índices de similaridade (>98,3%) contra genes homólogos da espécie *Weissella paramesenteroides*



**Figura 4.** Heatmap de presença e ausência gênica das linhagens de *Pediococcus acidilactici*, com árvore filogenética à esquerda. Representação do pangenoma de *P. acidilactici* a partir da matriz binária de presença/ausência de genes entre as linhagens, associada a uma árvore filogenética. A variação gênica é visualizada por blocos em azul (presente) e branco (ausente), revelando o core e o genoma acessório da espécie.

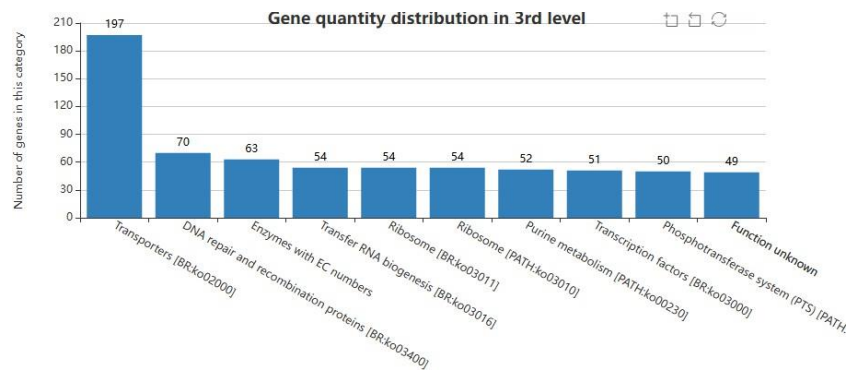
#### 4.5 Anotação gênica e ontologia

O alinhamento do genoma da PA13 contra base de dados do KEGG revelou que a categoria com o maior número de genes (363) corresponde às Famílias de proteínas envolvidas em processamento de informação genética, enquanto a segunda maior (300) está relacionada às Famílias de proteínas do metabolismo. A análise também destaca categorias como Metabolismo de carboidratos (196 genes), Metabolismo de membrana (132 genes), e Transporte de membrana (100 genes). As categorias com menor número de genes incluem Metabolismo de nucleotídeos (72 genes) e Metabolismo de cofatores e vitaminas (66 genes).



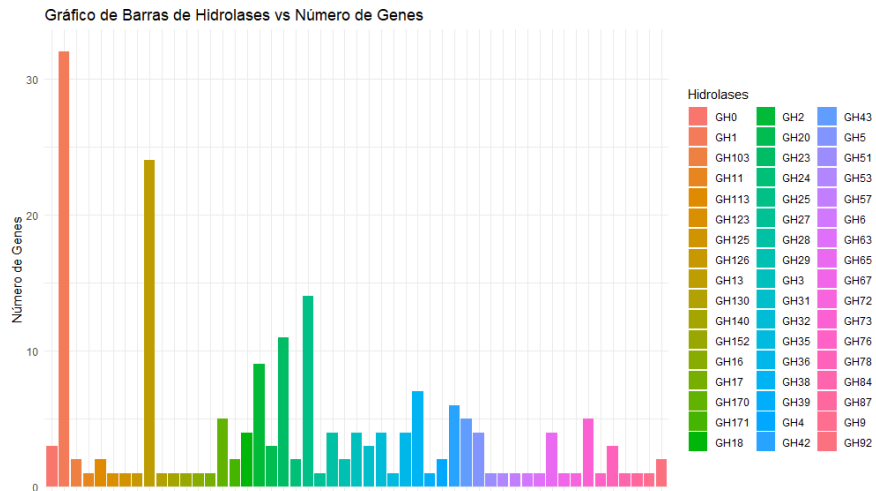
**Figura 5. Distribuição de genes preditos no segundo nível de categoria funcional pelo KEGG.** O gráfico de barras representa a quantidade de genes classificados em diferentes categorias funcionais no segundo nível de categorização de uma anotação realizada utilizando-se o banco de dados de genes ortólogos do KEGG.

A categoria mais abundante neste nível é a de Transportadores (197 genes), que desempenham um papel vital no movimento de substâncias através de membranas celulares. Outras categorias importantes incluem Reparo de DNA e proteínas de recombinação (70 genes), Enzimas com números EC (63 genes), Biogênese de tRNA (54 genes), Ribossomo (54 genes), e Metabolismo de purinas (52 genes). A categoria Função desconhecida aparece com 49 genes, sugerindo a existência de genes que ainda não foram caracterizados funcionalmente.



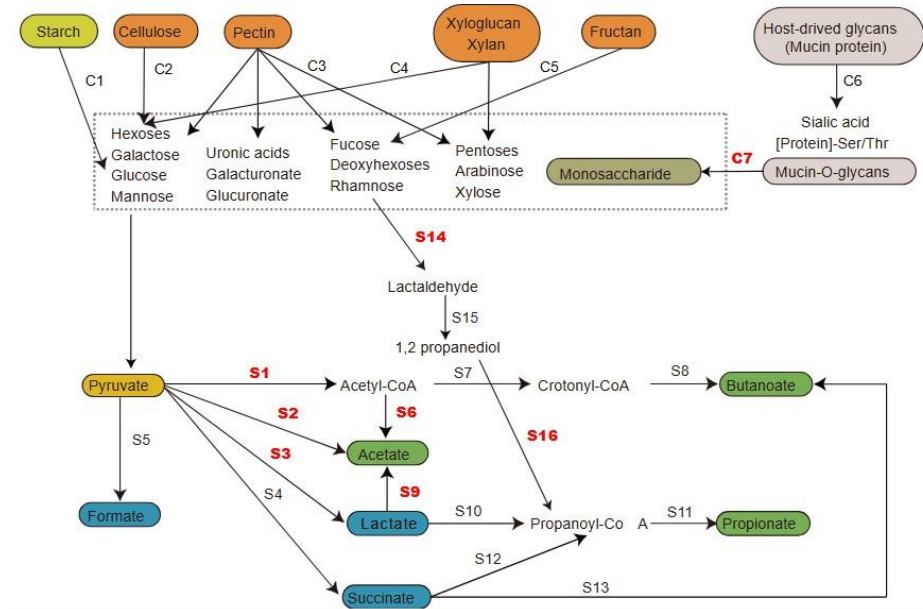
**Figura 6. Distribuição da quantidade de genes no terceiro nível.** O gráfico de barras representa a quantidade de genes em categorias funcionais KEGG mais específicas (terceiro nível)

A Figura 7 ilustra a distribuição do número de genes por família de glicosil hidrolases (GH). A linhagem *Pediococcus acidilactici* Pa13 apresenta em seu genoma diversas GHs, notadamente pertencentes às famílias GH1, GH13 e GH32, cada uma com funções específicas na degradação de carboidratos complexos. Essas enzimas contribuem diretamente para a adaptação da linhagem ao trato gastrointestinal, promovendo a utilização de substratos dietéticos e prebióticos, que são, em grande parte, inacessíveis às enzimas digestivas do hospedeiro. Por exemplo, a inulinase (GH32) hidrolisa a inulina, e as amilases (GH13) degradam o amido, além de facilitar a simbiose com a microbiota intestinal. Por exemplo, ao quebrar polissacarídeos como a inulina, as enzimas do *Pediococcus acidilactici* Pa13 tornam esses nutrientes acessíveis para outras bactérias comensais, que então podem produzir ácidos graxos de cadeia curta essenciais para a saúde do hospedeiro.



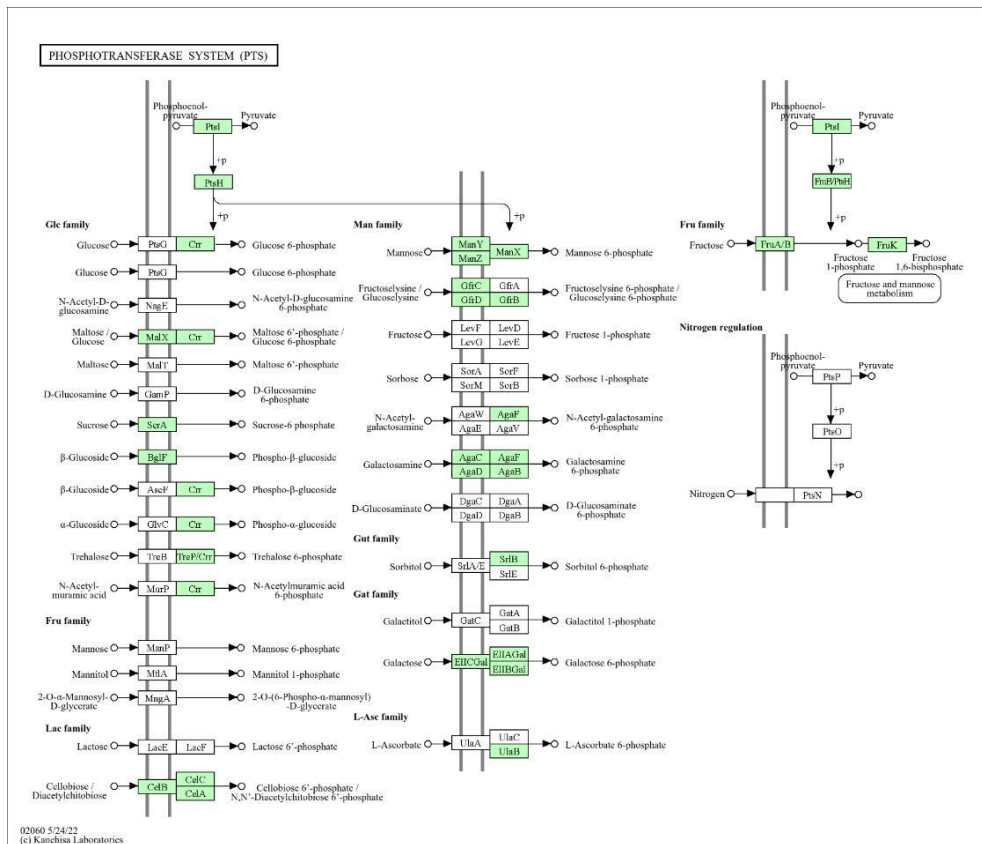
**Figura 7.** Gráfico de barras representando o número de genes associados a cada família de glicosil hidrolases (GH) identificadas no genoma de *P. acidilactici* Pa13. Análise da diversidade e abundância de genes codificantes de hidrolases envolvidas na degradação de polissacarídeos vegetais e glicanos do hospedeiro, com foco no potencial de adaptação intestinal da cepa. As cores indicam as diferentes famílias, conforme classificação CAZy (Carbohydrate-Active enZymes).

As principais rotas metabólicas de fermentação de carboidratos complexos até a formação de ácidos orgânicos em bactérias intestinais estão representadas na figura 8. A análise funcional do genoma de *Pediococcus acidilactici* Pa13 demonstrou a presença de vias que convergem para o metabolismo do piruvato, com produção de acetato, lactato e succinato. A conversão de monossacarídeos derivados da hidrólise de polissacarídeos dietéticos, como amido, celulose, e frutanos, é uma etapa central. A via C7, em particular, destaca a capacidade da linhagem em metabolizar glicanos derivados do hospedeiro, especialmente mucinas.



**Figura 8. Fluxo Metabólico de Degradação de Polissacarídeos e Formação de Metabólitos.** O Diagrama representa o fluxo metabólico desde a quebra inicial de polissacarídeos até a produção de compostos finais, incluindo ácidos graxos de cadeia curta.

A análise do sistema de fosfotransferase bacteriano (PTS) revelou que *P. acidilactici* Pa13 possui diversos genes funcionalmente ativos envolvidos no transporte fosforilado de carboidratos, marcados em verde na Figura 9. Foram identificados genes pertencentes a várias famílias PTS, com destaque para transportadores de glicose (*ptsG*, *crr*),  $\beta$ -glucosídeos (*bglF*), frutose e manose (*fruA/B*, *manY/Z*), celobiose (*celC*, *celD*), galactitol (*EII-Gal*) e ácido ascórbico (*ulaA*, *ulaB*, *ulaC*). Também foram observados genes regulatórios como *ptsN*, *ptsO* e *ptsP*, associados à integração metabólica entre as vias de carbono e nitrogênio.



**Figura 9.** Mapa do sistema de fosfotransferase bacteriano (PTS) em *Pedicoccus acidilactici* Pa13. Os genes marcados em verde representam os ortólogos anotados no genoma da linhagem, indicando os transportadores ativos para diferentes classes de carboidratos e suas respectivas vias metabólicas.

#### 4.6 Bacteriocinas

Genes codificadores de bacteriocinas foram preditos usando os softwares BAGEL4 e antiSMASH. No entanto, não foram identificadas regiões genômicas associadas à produção de bacteriocinas em nenhuma das linhagens analisadas. Portanto, o foco passa a ser a avaliação de outros marcadores de segurança, como a resistência aos antimicrobianos.

### 5. DISCUSSÃO

Em sintonia com a literatura que tem explorado o gênero *Pedicoccus* de forma ainda incipiente, este estudo se destaca por fornecer uma caracterização genômica e funcional aprofundada, que diferentemente dos estudos anteriores, realizamos uma análise pangenômica e filogenômica comparativa robusta. Isso nos permitiu investigar as bases moleculares de sua adaptação e segurança, um aspecto que era uma lacuna de conhecimento na pesquisa com a cepa

Pa13. Nesse sentido, a originalidade reside não apenas na nova linhagem, mas na abordagem probiogenômica que permitiu associar diretamente as características funcionais observadas *in vitro*.

A avaliação da montagem genômica de *Pediococcus acidilactici* Pa13 com os algoritmos SPAdes, SKESA e Unicycler demonstrou consistência entre os métodos, com destaque para SPAdes, que apresentou um leve ganho em extensão total do genoma e métricas de N50 comparáveis às demais ferramentas. A escolha de SPAdes como montagem final baseia-se não apenas na maior cobertura de sequência (2.157.767 bp), mas também em sua ampla aceitação na comunidade científica para montagem de genomas bacterianos, sendo especialmente eficaz para genomas de pequeno porte com estrutura circular. A baixa fragmentação (apenas 20 contigs), combinada com um GC de 42,08% (A porcentagem de GC esperada para a espécie *Pediococcus acidilactici* Pa geralmente varia entre 37% e 43%) e distribuição equilibrada dos tamanhos dos contigs, confirma que a montagem é de alta qualidade e adequada para análises como anotação e comparação genômica. A análise de qualidade dos genomas públicos de *P. acidilactici* obtidos do GenBank permitiu selecionar 30 genomas com critérios rigorosos de completude e contaminação. Todas as linhagens mostraram índices satisfatórios de completude e contaminação apresentando alta qualidade para análises comparativas. Esses dados confirmam a confiabilidade dos genomas utilizados, pois completude acima de 95% e contaminação abaixo de 5% são os parâmetros mínimos recomendados para garantir robustez na inferência filogenética e pangênômica. O fato de várias linhagens atenderem a esses critérios, especialmente de origens diversas como Coreia do Sul, China e Estados Unidos, fortalece a abrangência e a diversidade das análises comparativas realizadas neste estudo (Coelho-Rocha, 2020; Arndt *et al.*, 2016).

A análise de identidade média de nucleotídeos (ANI) corroborou a classificação taxonômica da linhagem Pa13 realizada por MALDI-TOF por Coelho-Rocha (2020). Este resultado valida a montagem genômica utilizada e confirma que as análises funcionais subsequentes, como busca por genes de interesse probiótico, foram conduzidas sobre uma sequência genômica corretamente identificada. Ressalta-se que a determinação precisa da identidade genômica por ANI é um dos critérios adotados pela ANVISA para a regularização da comercialização de linhagens probióticas no Brasil, reforçando a importância deste tipo de validação taxonômica.

A alta representatividade da família *Lactobacillaceae* e da ordem *Lactobacillales* na análise LCA é esperada uma vez que a própria Pa13 está inserida em tais grupos taxonômicos (VIEIRA *et*

*al.*, 2023). Por outro lado, a análise pode sugerir que *Pediococcus acidilactici* Pa13 está inserida em um ecossistema tipicamente dominado por bactérias ácido-láticas, muitas das quais compartilham nichos funcionais semelhantes. Isso é compatível com os dados genômicos já discutidos nesta dissertação, que apontam para um perfil altamente adaptado da Pa13 à fermentação de carboidratos complexos, presença de sistemas PTS, glicosil hidrolases variadas (GH1, GH13, GH32) e produção de ácidos orgânicos como lactato e acetato (WANG *et al.*, 2019). Neste contexto, a associação dos genes de *P. acidilactici* Pa13 com outros táxons fermentativos como *Companilactobacillus farciminis*, *Liquorilactobacillus nagelii* e *Ligilactobacillus ubonensis* sugere que a linhagem coexiste com outras bactérias capazes de degradar substratos complexos do hospedeiro, como mucinas, amido resistente e fibras prebióticas. Isso complementa os dados funcionais levantados nas análises metabólicas, que indicaram um perfil metabólico diverso e voltado à simbiose intestinal, inclusive por meio da via C7 de utilização de glicanos do hospedeiro (ZÚÑIGA *et al.*, 2018). Além disso, a presença de *Enterococcus* e *Weissella* no ambiente pode representar tanto interações cooperativas como competitivas, especialmente no uso de substratos limitados (MA *et al.*, 2022). No entanto, o posicionamento filogenético e o repertório funcional da Pa13 podem sugerir vantagens competitivas expressas em sua elevada capacidade de transporte, uso eficiente de açúcares, baixa presença de genes de resistência antimicrobiana e perfil de segurança respaldado pela ausência de fatores clássicos de virulência.

A análise do pangenoma de *P. acidilactici* revela uma estrutura aberta ( $\alpha = 0,227$ ), o que significa que novos genes podem ser descobertos à medida que novas linhagens são incorporadas à análise, revelando grande potencial de bioprospecção de novas linhagens, visando ampliar a base funcional disponível para aplicações industriais e de saúde humana. Linhagens diferentes podem apresentar perfis funcionais específicos, desde produção de bacteriocinas até tolerância a ácidos biliares ou capacidade de metabolização de substratos variados (RAJPUT *et al.*, 2023). Isso também reflete a plasticidade genômica da espécie, que pode estar relacionada a fatores ecológicos, pressão seletiva de ambientes diversos e eventos de aquisição gênica horizontal, conforme sugerido também pela presença de centenas de genes com LCA em outras espécies de bactérias lácticas. No entanto, como fator limitante, apenas 31 genomas foram utilizados neste trabalho. Neste sentido, apesar de fornecer achados relevantes sob os aspectos pangenômicos da espécie, recomenda-se que estudos futuros investiguem esta espécie utilizando uma amostragem maior de isolados a fim de representar melhor sua diversidade genética (LI *et al.*, 2021).

O agrupamento associado à matriz de presença/ausência gênica revela dados consistentes entre linhagens com alta similaridade genômica, conforme observado na análise de ANI. A linhagem *P. acidilactici* Pa13 forma um clado com as linhagens SRCM100424, SRCM101189 e SRCM102024, sugerindo não apenas similaridade funcional, mas também um histórico evolutivo recente compartilhado. A linhagem KFRI\_F1493, por sua vez, aparece como um ramo próximo a esse grupo, indicando alto grau de parentesco com a linhagem Pa13 e que ambas tiveram um ancestral comum recente. Essa observação pode ser explorada em estudos filogenômicos para rastrear a origem de genes de interesse probiótico ou industrial e sua distribuição entre linhagens contemporâneas. Inclusive a linhagem KFRI F1493 é reconhecida por sua participação na fermentação tradicional da soja na Coreia, resultando no produto conhecido como Meju, base para diversos alimentos fermentados típicos do país, como doenjang e ganjang. Tais alimentos são produzidos por meio de processos naturais, nos quais bactérias ácido-láticas como *P. acidilactici* desempenham funções essenciais na degradação de açúcares e modulação do perfil sensorial e funcional do alimento (Jung; Chae; Shin, 2022).

Diferentemente de outras linhagens utilizadas em fermentações proteicas ou lipídicas, a linhagem KFRI F1493 apresenta um perfil enzimático distinto, com baixa ou nenhuma atividade para protease, lipase, esterase e amilase. No entanto, destaca-se pela elevada atividade de  $\beta$ -galactosidase e  $\beta$ -glucosidase, enzimas de grande interesse biotecnológico. A  $\beta$ -galactosidase é amplamente empregada na indústria de alimentos para a hidrólise da lactose, possibilitando a produção de derivados lácteos para indivíduos com intolerância, além de sua aplicação na síntese de galacto-oligosacarídeos (GOS), reconhecidos por sua ação prebiótica (Alshanberi; Al-Shaeri; Ansari, 2021). A produção microbiana de GOS de alta pureza tem se tornado um foco crescente de pesquisa, especialmente utilizando linhagens selecionadas capazes de realizar transgalactosilação com alta especificidade e rendimento (MARÁZ *et al.*, 2022). Nesse contexto, a presença de  $\beta$ -galactosidase funcional em *P. acidilactici* reforça sua aplicabilidade não apenas em fermentações tradicionais, mas também em formulações funcionais e alimentos voltados à saúde intestinal. Já a  $\beta$ -glucosidase, também presente na linhagem KFRI F1493, possui ampla aplicação na liberação de compostos bioativos, especialmente agliconas de isoflavonas, durante a fermentação de produtos derivados da soja. Essa transformação resulta em maior biodisponibilidade de compostos com atividade antioxidante e estrogênica leve, o que agrega valor funcional aos produtos fermentados (YANG *et al.*, 2024). Além disso, a  $\beta$ -glucosidase é estratégica na hidrólise de biomassa

lignocelulósica, convertendo celobiose e oligossacarídeos em glicose fermentável, etapa crucial para a produção de bioetanol e bioprodutos (AKRAM *et al.*, 2021).

Estudos recentes com *Lactiplantibacillus plantarum*, espécie próxima funcionalmente a *Pediococcus*, demonstraram alto desempenho de  $\beta$ -glucosidases 6-fosfato, sugerindo que linhagens adaptadas ao ambiente intestinal ou à fermentação vegetal têm um aparato enzimático voltado à utilização de substratos vegetais complexos (Godse; Fernandes; Kulkarni, 2025).

Assim, mesmo não expressando enzimas relacionadas à quebra de proteínas e lipídios, a linhagem *P. acidilactici* KFRI F1493 mostra-se altamente promissora para aplicações na biotecnologia de alimentos funcionais e fermentações especializadas, destacando-se pelo uso de substratos vegetais, síntese de compostos prebióticos e potencial para biorrefinaria.

Com relação ao genes exclusivos do Pa13, através do alinhamento pelo BLASTp contra o banco de dados do Uniprot apresentaram proteínas hipotéticas, genes de transposases (Pa13\_02080 e Pa13\_02185) e enzimas de metabolismo de carboidrato (Pa13\_02191 e Pa13\_02193), também mostrou altos índices de similaridade contra genes homólogos da espécie *Liquorilactobacillus nagelii*, que em estudos recentes têm destacado o potencial de espécies do gênero *Liquorilactobacillus* em diversas aplicações industriais e de saúde. A *Liquorilactobacillus nagelii* VUCC-R001, isolada de kombucha, apresenta características genômicas promissoras como a produção de dextranase GH70, enzima que sintetiza dextrana a partir da sacarose, polímero valioso em alimentos e biomateriais biomédicos (LARINI *et al.*, 2024). A dextrana produzida tem aplicações em espessantes, encapsulantes e agentes de liberação controlada em medicamentos (BECHTNER *et al.*, 2022). A cepa *L. nagelii* AGA58, isolada de shalgam, foi caracterizada como motil (Gram-positiva, catalase-negativa) e possui perfil genômico compatível com produção de bacteriocinas e tolerância a estresses do trato gastrointestinal, evidenciando seu potencial como probiótico (Yetiman; Ortakci, 2023).

Outra espécie com altos índices de similaridade encontrada foi a *Weissella paramesenteroides* que tem demonstrado grande potencial em diversas áreas da biotecnologia alimentícia, ambiental e da saúde. A cepa *W. paramesenteroides* MN2C2 produz nanopolissacarídeos estáveis e biocompatíveis, que exibiram potente atividade antioxidante e citotóxica seletiva contra células de câncer de cólon (Caco-2), fígado (HepG-2) e mama (MCF-7),

sugerindo aplicações promissoras em terapia antitumoral e preparo de biomateriais funcionais (AMER *et al.*, 2021). O genoma completo de *W. paramesenteroides* UFTM 2.6.1 revelou 1.926 genes, incluindo 99 associados a funções probióticas (resposta ao estresse, sobrevivência gastrointestinal, biossíntese de vitaminas) e genes para produzir pediocina, sem detecção de fatores de virulência ou resistência, sugerindo alta segurança e potencial funcional (ROCHA *et al.*, 2024).

A classificação funcional do genoma de *P. acidilactici* Pa13 revela um perfil coerente de um microrganismo adaptado à colonização intestinal e à rápida resposta metabólica. A predominância de genes relacionados a famílias proteicas e ao processamento de informação genética (como replicação, transcrição e tradução) reforça a importância de um aparato celular robusto para manutenção genômica e síntese proteica contínua. Isso é esperado para bactérias que enfrentam ambientes dinâmicos, como o trato gastrointestinal, onde a adaptação depende de regulação rápida e precisa da expressão gênica (JUNG *et al.*, 2022).

A segunda categoria mais abundante, relacionada à sinalização celular e processos metabólicos, indica a presença de sistemas de resposta a estímulos ambientais e controle fisiológico refinado. Em seguida, a terceira maior classe, metabolismo de carboidratos, está em total sintonia com o perfil fermentativo e comensal da Pa13, que parece depender da utilização eficiente de polissacarídeos dietéticos e glicanos do hospedeiro como fonte primária de energia. A presença significativa de genes relacionados ao transporte de membrana (100 genes) reforça esse perfil, pois muitos desses transportadores, como os sistemas PTS já discutidos, são fundamentais para captação seletiva de açúcares no intestino.

Este estudo identificou diferentes famílias de hidrolases que sustentam esta hipótese. As enzimas GH1 atuam principalmente na hidrólise de ligações  $\beta$ -D-glicosídicas, permitindo a degradação de compostos vegetais como celobiose e glicosídeos naturais. Suas principais atividades incluem  $\beta$ -glucosidase e  $\beta$ -galactosidase, que liberam glicose a partir de carboidratos vegetais, fornecendo uma fonte de energia essencial para a bactéria. Além disso, a ação dessas enzimas contribui para a digestão de fibras e liberação de açúcares menores, que podem ser utilizados por outros microrganismos benéficos do ecossistema intestinal, fortalecendo a interação simbiótica (Withers, 2012). A família GH13, amplamente conhecida como a "família das amilases", está associada à degradação de polissacarídeos ricos em glicose com ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6, como amido e glicogênio. Enzima como  $\alpha$ -amilase permite que a *P. acidilactici* Pa13 utilize

fontes de amido da dieta humana, promovendo seu crescimento em nichos intestinais ricos nesse substrato. A quebra eficiente desses polissacarídeos em maltose e glicose é essencial para a produção de ácido lático e para a acidificação do ambiente, inibindo patógenos e modulando positivamente o pH intestinal (Svensson; Janecek, 2021). Já as enzimas da família GH32 são especializadas na metabolização de frutanos como inulina e sacarose, por meio de atividades como inulinase, invertase e levansucrase. Essas enzimas possibilitam a degradação de carboidratos prebióticos frequentemente encontrados na dieta humana. Ao utilizar frutooligosacarídeos (FOS), a linhagem Pa13 não só se beneficia energeticamente, mas também modula a microbiota intestinal, fornecendo substratos fermentáveis para bactérias comensais e promovendo a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), como o acetato, com efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores (Czjzek; Van den Ende, 2021). A integração funcional dessas três famílias enzimáticas no metabolismo de *P. acidilactici* Pa13 evidencia uma versatilidade metabólica adaptativa, que permite à linhagem explorar diversos substratos disponíveis no intestino, competir eficientemente com microrganismos patogênicos e contribuir para a manutenção da homeostase intestinal. Essa capacidade multifuncional reforça o potencial dessa cepa como um probiótico seguro, eficaz e metabolicamente ativo, com possíveis aplicações clínicas e nutricionais, sendo importante para o desenvolvimento de formulações contendo prebióticos.

A presença de genes no genoma de *P. acidilactici* Pa13 envolvidos na produção de ácidos orgânicos por rotas fermentativas clássicas, revela uma linhagem metabolicamente versátil, ecologicamente competitiva e potencialmente benéfica à saúde do hospedeiro. Isso fortalece sua proposta de aplicação como probiótico funcional com efeito trófico e imunológico no intestino (Gänzle, 2015; Altermann *et al.*, 2005). Uma rota de especial interesse é a via C7, que envolve o aproveitamento de glicanos derivados do hospedeiro, como as mucinas, proteínas ricas em açúcares complexos que revestem o epitélio intestinal. Durante a degradação dessas mucinas, são liberados monossacarídeos como fucose, N-acetilglicosamina e ácido siálico, os quais podem ser aproveitados por bactérias adaptadas a ambientes com baixo aporte de carboidratos dietéticos (Koh *et al.*, 2016; Gareau *et al.*, 2010). A presença de vias relacionadas à metabolização desses açúcares no genoma da Pa13 sugere um grau elevado de adaptação ecológica, permitindo sua sobrevivência e crescimento mesmo em fases de jejum ou dieta pobre em fibras. Estes achados também corroboram com o trabalho prévio de Coelho-Rocha (2020) que demonstrou a capacidade da Pa13 de degradar mucina *in vitro*. O catabolismo de mucinas também é importante do ponto de vista

simbiótico, pois essas rotas são frequentemente utilizadas por microrganismos comensais que participam da manutenção da homeostase intestinal. Além disso, os metabólitos gerados nessas rotas, como propionato e butirato, possuem reconhecido papel anti-inflamatório e imunomodulador, além de atuarem como fonte de energia para os colonócitos e contribuírem para a integridade da barreira intestinal (Koh *et al.*, 2016; Gareau *et al.*, 2010).

A diversidade de genes do sistema PTS identificada em *P. acidilactici* Pa13 reflete uma sofisticada adaptação metabólica, compatível com a colonização eficiente do TGI. O sistema PTS, além de transportar carboidratos, realiza simultaneamente sua fosforilação, permitindo que esses açúcares ingressem diretamente em vias fermentativas. A presença de *ptsG* e *crr* permite a captação rápida de glicose, essencial para ambientes onde esse açúcar é frequentemente liberado por ação de enzimas endógenas ou por outros membros da microbiota. Já os genes *bglF* e *ascF* indicam o uso de  $\beta$ -glicosídeos e derivados de plantas, ressaltando a capacidade da linhagem de degradar componentes vegetais complexos (Gänzle, 2015; Altermann *et al.*, 2005). A identificação de transportadores específicos para manose e frutose, como *manY/Z* e *fruA/B*, é indicativa de uma ampla tolerância à diversidade de açúcares monossacarídicos presentes na alimentação humana. A habilidade de utilizar celobiose e seus derivados, sugere um papel ecológico importante da Pa13 na degradação de fibras vegetais e na liberação de substratos fermentáveis que beneficiam outras bactérias comensais, reforçando sua atuação simbiótica (Aboulwafa; Zhang; Saier, 2019). A presença do complexo PTS para galactitol (*EII-Gal*) é relevante, pois esse açúcar não é amplamente metabolizado por bactérias intestinais comuns, o que confere uma vantagem competitiva à Pa13 em condições de limitação de nutrientes. Além disso, a identificação dos genes *ulaA*, *ulaB* e *ulaC*, que codificam transportadores e enzimas relacionados ao uso de ácido ascórbico (vitamina C), um substrato raro como fonte de energia, mas potencialmente disponível em dietas ricas em frutas (Conte; van Buuringen; Lefeber, 2021).

Por fim, os genes *ptsN*, *ptsO* e *ptsP* indicam que o sistema PTS da linhagem Pa13 está integrado a mecanismos regulatórios de balanço entre carbono e nitrogênio, o que lhe permite ajustar seu metabolismo de acordo com a disponibilidade de nutrientes no ambiente (Velázquez *et al.*, 2007). Essa integração sugere que a linhagem não apenas se adapta ao perfil de carboidratos intestinais, mas também responde a flutuações ambientais com flexibilidade metabólica. Assim, os dados apresentados confirmam o papel central do sistema PTS na plasticidade ecológica e na

robustez funcional de *P. acidilactici* Pa13, fortalecendo sua aplicabilidade como probiótico promissor e funcional em contextos clínicos e alimentares.

Embora o estudo tenha focado nos aspectos benéficos, recomenda-se os investigar o resistoma.

## 6. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou, por meio de análises genômicas e comparativas *in silico*, que a linhagem *Pediococcus acidilactici* Pa13 apresenta um repertório funcional robusto e compatível com aplicações probióticas. A montagem genômica de alta qualidade permitiu identificar um conjunto diversificado de genes relacionados à adaptação intestinal produção de ácidos orgânicos e rotas de metabolização de fibras e glicanos do hospedeiro que reforça sua capacidade de adaptação ecológica em ambientes intestinais. A ausência de genes de virulência clássicos e de genes de resistência antimicrobiana adquiridos sugerem um perfil de segurança genômica aceitável para aplicações clínicas, embora análises funcionais adicionais sejam recomendadas. A estrutura aberta do pangenoma de *P. acidilactici* observada neste trabalho amplia as possibilidades de descoberta de novas linhagens com funções probióticas específicas.

## 7. PERSPECTIVAS

Como desdobramento dos resultados obtidos, sugere-se a realização de estudos funcionais *in vitro* e *in vivo* para validar o potencial probiótico de *P. acidilactici* Pa13, para avaliar sua adesão a células epiteliais humanas, resistência a condições gastrointestinais simuladas e capacidade de modular a resposta imune e a composição da microbiota intestinal. Ensaio com modelos animais de inflamação intestinal podem fornecer evidências adicionais sobre seus efeitos terapêuticos.

Além disso, visando compreender os mecanismos moleculares da Pa13, a expressão e regulação dos genes de interesse identificados, como os relacionados às vias de utilização de frutanos, mucinas e sistemas PTS, devem ser avaliadas por abordagens de transcriptômica ou proteômica em diferentes condições ambientais tais como as do TGI.

Outra abordagem que poderá ser explorada em trabalhos futuros é a predição e caracterização de adesinas no genoma da linhagem *Pediococcus acidilactici* Pa13. As adesinas são proteínas de superfície que desempenham papel essencial na aderência de microrganismos probióticos às células epiteliais intestinais, sendo consideradas marcadores funcionais relevantes para a persistência no trato gastrointestinal. A identificação dessas proteínas poderá ser conduzida por ferramentas como VaxiJen ou SPAAN, permitindo selecionar candidatos com potencial de adesão e interação com o hospedeiro. Esse tipo de análise contribuirá para ampliar a compreensão sobre os mecanismos de colonização da Pa13 e fortalecerá sua proposta como microrganismo probiótico seguro e funcional, especialmente se associada a testes de adesão *in vitro* ou ensaios celulares futuros.

No campo biotecnológico, considerando a diversidade intraespécie evidenciada pelo pangenoma aberto, novas linhagens brasileiras devem ser isoladas e sequenciadas, contribuindo para a ampliação da base genômica da espécie *P. acidilactici* e promovendo o fortalecimento da biotecnologia nacional com linhagens da biodiversidade brasileira.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOULWABA, M.; ZHANG, Z.; SAIER JÚNIOR, M. H. Protein: protein interactions in the cytoplasmic membrane apparently influencing sugar transport and phosphorylation activities of the *E. coli* phosphotransferase system. *PLOS One*, v. 14, n. 7, p. e0219332, 2019. DOI: 10.1371/journal.pone.0219332.
- AKRAM, F. et al. Thermostable cellulases: Structure, catalytic mechanisms, directed evolution and industrial implementations. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 151, p. 111597, nov. 2021.
- ALSHANBERI, A. M.; AL-SHAERI, M. A.; ANSARI, S. A. Overviewing the Application of  $\beta$ -Galactosidase “Immobilized on Nanoparticles” in Dairy Industries. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 64, 2021.
- ALTERMANN, E. et al. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 102, n. 11, p. 3906–3912, 2005. DOI: 10.1073/pnas.0409188102,
- AMER, M. N. et al. Nano-Exopolysaccharide From The Probiotic *Weissella Paramesenteroides* MN2C2: Production, Characterization And Anticancer Activity. *Egyptian Journal of Chemistry*, [S. l.], v. 64, n. 12, p. 7123-7133, 2021. DOI: 10.21608/ejchem.2021.81338.4031.
- ARNDT, D. et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Research*, v. 44, n. W1, p. W16-21, 2016. DOI: 10.1093/nar/gkw387.
- BANKEVICH, A. et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, v. 19, n. 5, p. 455-77, 2012. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021.
- BECHTNER, J. et al. The C-Terminal Domain of *Liquorilactobacillus nagelii* Dextranucrase Mediates the Production of Larger Dextrans Compared to *Liquorilactobacillus hordei*. *Gels*, Basel, v. 8, n. 3, p. 171, mar. 2022. DOI: 10.3390/gels8030171.
- BERMUDEZ-BRITO, M. et al. Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism*, v. 61, n. 2, p. 160-174, 2012.
- BLACKWOOD, B. P. et al. Probiotic *Lactobacillus* Species Strengthen Intestinal Barrier Function and Tight Junction Integrity in Experimental Necrotizing Enterocolitis. *Journal of Probiotics and Health*, v. 5, n. 1, p. 1-20, 2017.
- BLIN, Kai et al. antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation. *Nucleic Acids Research*, v. 51, n. W1, p. W46–W50, 2023. Disponível <https://doi.org/10.1093/nar/gkad344>.
- BORGES, S.; BARBOSA, J.; TEIXEIRA, P. Gynecological health and probiotics. In: *Probiotics*,

Prebiotics, and Synbiotics. p. 741-52, 2016.

CAPUCO, A. et al. Current Perspectives on Gut Microbiome Dysbiosis and Depression. *Advances in Therapy*, v. 37, p. 1328-1346, 2020.

CARATTOLI, A.; HASMAN, H. PlasmidFinder and In Silico pMLST: Identification and Typing of Plasmid Replicons in Whole-Genome Sequencing (WGS). In: DE LA CRUZ, F. (Ed.). *Horizontal Gene Transfer. Methods in Molecular Biology*, v. 2075. New York, NY: Humana, 2020. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9877-7\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9877-7_20).

CHOI, Dae Gyu et al. Comparative pangenome analysis of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus lactis* provides new insights into the adaptive evolution by horizontal gene acquisitions. *BMC Genomics*, v. 25, art. 28, 3 jan. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09945-7>.

COELHO-ROCHA, N. D. Prospecção de bactérias lácticas para uso como probióticos e avaliação do efeito protetor em modelo murino de mucosite intestinal induzida por 5-FU. 2020. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CONTE, Federica; VAN BUURINGEN, Nicole; LEFEBER, Dirk J. Galactose in human metabolism, glycosylation and congenital metabolic diseases: Time for a closer look. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*, v. 1865, n. 8, p. 129898, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2021.129898>.

COSANSU, S.; MOL, S.; ALAKAVUK, D. U. Effect of a *Pediococcus* Culture on the Sensory Properties and Ripening of Anchovy Marinade at 4°C and 16°C. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 10, n. 3, p. 373-380, 2010.

CZJZEK, Mirjam; VAN DEN ENDE, Win. Glycoside Hydrolase Family 32 – Cazypedia. Cazypedia, 2021. Disponível em: [https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside\\_Hydrolase\\_Family\\_32](https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_Hydrolase_Family_32)

D'ARGENIO, V.; SALVATORE, F. The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clinica Chimica Acta*, v. 451, p. 97-102, 2015.

DI CAGNO, R.; FILANNINO, P.; GOBBETTI, M. Fermented foods: dietary importance and microbial health benefits. In: *Encyclopedia of Human Nutrition*. Academic Press, p. 43-51, 2013.

DÍEZ, L. et al. Antimicrobial activity of pediocin PA-1 against *Oenococcus oeni* and other wine bacteria. *Food Microbiology*, v. 31, n. 2, p. 167-172, 2012.

FURLAN R.L. 2010. Aspectos fisiológicos da utilização de probióticos e prebióticos visando a saúde intestinal. Memórias Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Avicultura del Ecuador. AMEVEA-E, Quito. 25p.

- GAO, K. et al. Immunomodulation and signaling mechanism of *Lactobacillus rhamnosus* GG and its components on porcine intestinal epithelial cells stimulated by lipopolysaccharide. *Journal of Microbiology Immunology and Infection*, v. 14, n. 5, p. 1684-1182, 2015.
- GÄNZLE, M. G. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, v. 2, p. 1–6, 2015. DOI: 10.1016/j.cofs.2015.03.001
- GAREAU, M. G.; SHERMAN, P. M.; WALKER, W. A. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, v. 7, n. 9, p. 503-514, 2010.
- GARVIE, E. I. Genus *Pediococcus*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, v. 2, p. 1075-1079, 1986.
- HAMMES, W. P.; HERTEL, C. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: *Ecology of Lactic Acid Bacteria*. Springer, p. 19-54, 2009.
- HILL, C. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, v. 11, p. 506-514, 2014.
- HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre and probiotics. *Food Research*, v. 35, p. 109-116, 2002.
- JACOBSEN, C. N. et al. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 11, p. 4949-4956, Nov 1999.
- JUNG, J. et al. High-quality metagenome-assembled genomes from proximal colonic microbiomes of synbiotic-treated Korean native black pigs reveal changes in functional capacity. *Scientific Reports*, v. 12, n. 1, art. 14595, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-18503-2>.
- JUNG, S.-J.; CHAE, S.-W.; SHIN, D.-H. Fermented Foods of Korea and Their Functionalities. *Fermentation*, v. 8, n. 11, p. 645, 15 nov. 2022.
- KACI, G. et al. Inhibition of the NF- $\kappa$ B Pathway in Human Intestinal Epithelial Cells by Commensal *Streptococcus salivarius*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, n. 13, p. 4681-4684, 2011.
- KOH, A. et al. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell*, v. 165, n. 6, p. 1332-1345, 2016.

KUNDU, P. et al. Our Gut Microbiome: The Evolving Inner Self. *Cell*, v. 171, n. 7, p. 1481-1493, 2017.

LARINI, I. et al. Comparative genomics reveals the potential biotechnological applications of *Liquorilactobacillus nagelii* VUCC-R001, a strain isolated from kombucha tea. *Food Bioscience*, [S. l.], v. 59, p. 104001, 2024. DOI: 10.1016/j.fbio.2024.104001.

LEUNG, C.; RIVERA, L.; FURNESS, J. B.; ANGUS, P. W. The role of the gut microbiota in NAFLD. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, v. 13, n. 7, p. 412-425, 2016.

LI, Z. et al. Comparative genomics analysis of *Pediococcus acidilactici* species. *Journal of Microbiology*, v. 59, n. 7, p. 645-654, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12275-021-0618-6>.

LLOYD-PRICE, J.; ABU-ALI, G.; HUTTENHOWER, C. The healthy human microbiome. *Genome Medicine*, v. 8, n. 1, p. 51, 2016.

LUPP, C. et al. Host-Mediated Inflammation Disrupts the Intestinal Microbiota and Promotes the Overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell Host & Microbe*, v. 2, n. 2, p. 119-129, 2007.

MA, H. et al. Microbial Population Succession and Community Diversity and Its Correlation with Fermentation Quality in Soybean Meal Treated with *Enterococcus faecalis* during Fermentation and Aerobic Exposure. *Microorganisms*, v. 10, n. 3, p. 530, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/10/3/530>.

MACIA, L. et al. Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome. *Nature Communications*, v. 6, p. 6734, 2015.

MANTIS, N. J.; ROL, N.; CORTHÉSY, B. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunology*, v. 4, n. 6, p. 603-611, 2011.

MARÁZ, A. et al. Recent developments in microbial production of high-purity galactooligosaccharides. v. 38, n. 6, 20 abr. 2022.

NIETO-LOZANO, J. C. et al. The effect of the pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* in Spanish dry-fermented sausages and frankfurters. *Food Control*, v. 21, n. 5, p. 679-685, 2010.

O'MAHONY, C. et al. Commensal-induced regulatory T cells mediate protection against pathogen-stimulated NF- $\kappa$ B activation. *PLoS Pathogens*, v. 4, n. 8, e1000112, 2008.

OLIVEIRA, A. C. et al. Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying. *Journal of Microencapsulation*, v. 24, n. 7, p. 685-693, 2007.

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

PAPAGIANNI, M.; ANASTASIADOU, S. Pediocins: The bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications. *Microbial Cell Factories*, v. 8, n. 1, p. 1-16, 2009.

PETERSON, C. T.; KUMAR, M.; GROVER, M. Gut Microbiota Composition and Diversity in Humans and Mice: Functional, Metabolic, and Translational Implications. *Nutrients*, v. 12, n. 4, p. 1021, 2020.

PICKARD, J. M. et al. Gut Microbiota: Role in Pathogen Colonization, Immune Responses and Inflammatory Disease. *Immunological Reviews*, v. 279, n. 1, p. 70-89, 2017.

PLAZA-DIAZ, J.; RUIZ-OJEDA, F. J.; GIL-CAMPOS, M.; GIL, A. Mechanisms of action of probiotics. *Advances in Nutrition*, v. 10, supl. 1, p. S49–S66, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/advances/nmy063>.

RAJPUT, A. et al. Pangenome analysis reveals the genetic basis for taxonomic classification of the Lactobacillaceae family. *Food Microbiology*, v. 115, art. 104334, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104334>.

RAVISH GODSE; FERNANDES, J. M.; KULKARNI, R. Characterization of  $\beta$ -glucosidase activity of a *Lactiplantibacillus plantarum* 6-phospho- $\beta$ -glucosidase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 109, n. 1, 8 abr. 2025.

REDDEL, S.; PUTIGNANI, L.; CHIERICO, F. The Impact of Low-FODMAPs, Gluten-Free, and Ketogenic Diets on Gut Microbiota Modulation in Pathological Conditions. *Nutrients*, v. 11, n. 2, p. 373, 2019.

ROCHA, B. M. d. et al. Unlocking Probiotic Potential: Genomic Insights into *Weissella paramesenteroides* UFTM 2.6.1. *Probiotics & Antimicrobial Proteins*, [S. l.], 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12602-024-10409-x>.

SAKAMOTO, T., ORTEGA, J.M. Taxallnomy: an extension of NCBI Taxonomy that produces a hierarchically complete taxonomic tree. *BMC Bioinformatics* 22, 388. <https://doi.org/10.1186/s12859-021-04304-3>, 2021.

SANDERS, M. E. Probiotics: definition, sources, selection, and uses. *Clinical Infectious Diseases*, v. 46, Supplement\_2, p. S58-S61, 2008.

- SARAIVA, M.; O'GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology*, v. 10, n. 3, p. 170-181, 2010.
- SCHOLZ, J. L.; ABRAHAM, S. N.; WALTL, S. Interleukin-10: An anti-inflammatory cytokine with therapeutic potential in the intestine. *Clinical & Developmental Immunology*, v. 2011, p. 1-10, 2011.
- SEEMANN, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, v. 30, n. 14, p. 2068-2069, jul. 2014. PMID: 24642063.
- SHI, Y. et al. Restoration of cefixime-induced gut microbiota changes by Lactobacillus cocktails and fructooligosaccharides in a mouse model. *Microbiological Research*, v. 200, p. 14-24, 2017.
- SKARIYACHAN, S.; GOVINDARAJAN, S. Biopreservation potential of antimicrobial protein producing *Pediococcus* spp. towards selected food samples in comparison with chemical preservatives. *International Journal of Food Microbiology*, v. 291, p. 189-196, 2019.
- SOUVOROV, A.; AGARWALA, R.; LIPMAN, D. J. SKESA: strategic k-mer extension for scrupulous assemblies. *Genome Biology*, v. 19, n. 1, p. 153, 4 out. 2018. DOI: 10.1186/s13059-018-1540-z.
- SVENSSON, Birte; JANECEK, Stefan. Glycoside Hydrolase Family 13 – Cazypedia. Cazypedia, 2021. Disponível em: [https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside\\_Hydrolase\\_Family\\_13](https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_Hydrolase_Family_13)
- TAKATA, K. et al. The lactic acid bacterium *Pediococcus acidilactici* suppresses autoimmune encephalomyelitis by inducing IL-10-producing regulatory T cells. *PLoS One*, v. 6, n. 11, e27644, 2011.
- 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. DOI: 10.1093/nar/gky383.
- VELÁZQUEZ, Francisco; PFLÜGER, Katharina; CASES, Ildefonso; DE EUGENIO, Laura I.; DE LORENZO, Víctor. The phosphotransferase system formed by PtsP, PtsO, and PtsN proteins controls production of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology*, v. 189, n. 12, p. 4529–4533, jun. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JB.00033-07>
- VENTURA, M.; TURRONI, F.; VAN SINDEREN, D. Probiogenomics as a tool to obtain genetic insights into adaptation of probiotic bacteria to the human gut. *Bioengineered Bugs*, v. 3, n. 2, p. 73-79, 2012.

VIEIRA, K. et al. Orange juice containing *Pediococcus acidilactici* CE51 modulates the intestinal microbiota and reduces induced inflammation in a murine model of colitis. *Scientific Reports*, v. 13, n. 1, p. 18513, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-45819-4>.

VINOLO, M. A. et al. Regulation of inflammation by short chain fatty acids. *Nutrients*, v. 3, n. 10, p. 858-876, 2011.

WANG, M. et al. Lactic acid bacteria as mucosal delivery vehicles: a realistic therapeutic option. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 100, n. 13, p. 5691-5701, 2016.

WANG, S. et al. Combined supplementation of *Lactobacillus fermentum* and *Pediococcus acidilactici* promoted growth performance, alleviated inflammation, and modulated intestinal microbiota in weaned pigs. *BMC Veterinary Research*, v. 15, n. 1, p. 239, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1991-9>.

WICK RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol*. 2017 Jun 8;13(6):e1005595. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005595.

WITHERS, Stephen. Glycoside Hydrolase Family 1 – *Cazypedia*. *Cazypedia*, 2012. Disponível em: [https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside\\_Hydrolase\\_Family\\_1](https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_Hydrolase_Family_1)

YANG, W. et al. Microbial production and applications of  $\beta$ -glucosidase-A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 256, p. 127915, 1 jan. 2024.

YETIMAN, A. E.; ORTAKCI, F. Genomic, probiotic, and metabolic potentials of *Liquorilactobacillus nagelii* AGA58, a novel bacteriocinogenic motile strain isolated from lactic acid-fermented shalgam. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, [S. l.], v. 135, n. 1, p. 34-43, 2023. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2022.10.008.

XIE, Z.; TANG, H. ISEScan: automated identification of insertion sequence elements in prokaryotic genomes. *Bioinformatics*, v. 33, n. 21, p. 3340-3347, nov. 2017. DOI: 10.1093/bioinformatics/btx433.

ZHANG, Y.-Z.; LI, Y.-Y. Inflammatory bowel disease: Pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, v. 20, n. 1, p. 91-99, 2014.

ZHOU, Xiuzhen et al. Characterization of *Streptococcus pneumoniae* Macrolide Resistance and Its Mechanism in Northeast China over a 20-Year Period. *Microbiology Spectrum*, v. 10, n. 5, p. e0054622, 2022. DOI: 10.1128/spectrum.00546-22.

ZÚÑIGA, Manuel; MONEDERO, Vicente; YEBRA, María J. Utilization of Host-Derived Glycans by Intestinal Lactobacillus and Bifidobacterium Species. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, art. 1917, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01917>.