

ISABELA MARIA FERNANDES DE OLIVEIRA

**GENÔMICA COMPARATIVA E PREDIÇÃO DE  
PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS EM GENOMAS DE  
*STREPTOCOCCUS* ISOLADOS DO RÚMEN BOVINO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

O48g  
2017  
Oliveira, Isabela Maria Fernandes, 1990-  
Genômica comparativa e predição de peptídeos  
antimicrobianos em genomas de *Streptococcus* isolados do  
rúmen bovino / Isabela Maria Fernandes Oliveira. – Viçosa, MG,  
2017.

xiii, 109f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Hilário Cuquetto Mantovani.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Bacteriocinas. 2. *Streptococcus lutetiensis*.  
3. Ruminantes. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento  
de Microbiologia. Programa de Pós-graduação em Microbiologia  
Agrícola. II. Título.

CDD 22 ed. 579.26

ISABELA MARIA FERNANDES DE OLIVEIRA

**GENÔMICA COMPARATIVA E PREDIÇÃO DE  
PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS EM GENOMAS DE  
*STREPTOCOCCUS* ISOLADOS DO RÚMEN BOVINO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 26 de junho de 2017.

  
Mateus Ferreira Santana  
(Coorientador)

  
Tiago Antônio de Oliveira Mendes

  
Hilário Cuquetto Mantovani  
(Orientador)

*A Deus, pelas conquistas até o momento.*

## **Ofereço**

*A minha irmã, Amanda, pelo apoio incondicional, confiança e amor.  
Ao meu pai, José Nelci, pelo esforço para tornar meus sonhos realidade.*

## **Dedico**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de realização do curso e conclusão de mais essa etapa da minha formação acadêmica.

Ao Departamento de Microbiologia, pelo acolhimento e suporte durante todo o trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão das bolsas de estudo.

Ao meu pai por ser meu exemplo de força e superação, e a minha irmã, Amanda, por ser meu suporte, o seu amor me faz ir mais longe.

Ao professor Hilário Cuquetto Mantovani, pela orientação, direcionamentos, disponibilidade e incentivo. A sua presença e confiança a mim depositadas me fizeram acreditar que seria capaz. Minha eterna gratidão, admiração e respeito.

Às meus coorientadores, Denise e Mateus pelos ensinamentos e sugestões que contribuíram para melhoria do meu trabalho.

Aos professores e funcionários de toda UFV, em especial os relacionados ao curso de Ciências Biológicas, os quais colaboraram imensamente para minha formação.

Aos professores do Departamento de Microbiologia pelos constantes ensinamentos pessoais e profissionais.

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Microbiologia pela colaboração e agradável convivência.

Aos amigos do Laboratório de Anaeróbios: Elsa, Bianca, Sofia, Déborah, Fábria, Felipe, Juliana, Aline, Cláudia, Analice, Fernanda, Ana Julia, Letícia e Yasmin pela amizade e cumplicidade durante todos estes anos de trabalho e estudo. Em especial a Sofia, pela ajuda durante a elaboração e execução dos experimentos.

Às minhas irmãs de casa: Anny, Favero, Verônica, Alexandra, Fernanda, Leticia, Luzia e Mirela pelo amor, carinho, apoio e presença constante, vocês fizeram de Viçosa meu lar.

À toda turma de Ciências Biológicas/2010 pelos inúmeros momentos de descontração durante todos esses anos de Viçosa. Aos que levo para vida: Gis, Marcella, Aninha, Alice, Robson e Miguel pelos momentos inesquecíveis, cumplicidade, paciência e companheirismo.

Aos meus grandes e eternos amigos de Belo Horizonte e Curvelo por compreenderem que amizade é se fazer presente e não estar presente todo o tempo. Vocês fazem sorrir meu coração!

A Universidade de Aberystwyth/IBERS pela parceria e por abrir as portas para realização do meu intercâmbio e colaboração com minha pesquisa.

Aos amigos de trabalho do IBERS pela paciência, constantes ensinamentos e disponibilidade, em especial a Linda que se fez presente do início ao fim. À professora Sharon e ao Chris pela supervisão, colaboração e receptibilidade, me senti parte do grupo de pesquisa desde o primeiro dia.

Aos amigos do ‘C floor’ que me acolheram como a ‘irmazinha brasileira’, meu intercâmbio foi completo porque fiz parte da vida de vocês. E a todos que conheci em Aberystwyth e que fizeram a distância e a saudade de casa ser apenas um detalhe.

Aos meus muitos amigos, que fiz em Viçosa e durante o mestrado, pela convivência, conversas e aprendizados.

Enfim, a todos que, mesmo não citados aqui, contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

**Muito Obrigada!**

## **BIOGRAFIA**

ISABELA MARIA FERNANDES DE OLIVEIRA, filha de José Nelci de Oliveira e Luciana Maria Fernandes de Oliveira, nasceu em 10 de dezembro de 1990, em Curvelo – Minas Gerais.

Ingressou no curso de Ciências Biológicas, na Universidade Federal de Viçosa, em Março de 2010, pelo qual se graduou Bacharel em Ciências Biológicas em Janeiro de 2015.

Iniciou, em março de 2015, o curso de mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, com término em Junho de 2017.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>x</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xiii</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>3</b>
1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
1.1.1 Doenças infecciosas e resistência a antibióticos.....	3
1.1.2 Peptídeos antimicrobianos produzidos por bactérias ruminais.....	4
1.1.3 Bacteriocinas .....	6
1.1.4 Identificação de genes de bacteriocinas por meio de análises <i>in silico</i> .....	8
1.1.5 Genômica comparativa de <i>Streptococcus</i> .....	10
1.2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	13
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>19</b>
2.1 INTRODUÇÃO.....	19
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
2.2.1 Obtenção, cultivo e identificação dos microrganismos .....	21
2.2.2 Avaliação do espectro de ação.....	22
2.2.3 Extração de DNA dos isolados com atividade antimicrobiana .....	24
2.2.4 Amplificação do gene do RNA ribossomal 16S.....	24
2.2.5 Sequenciamento e anotação dos genomas .....	25
2.2.6 Análises <i>in silico</i> dos genomas de bactérias ruminais para prospecção de AMPs .....	25
2.3 RESULTADOS .....	27
2.3.1 Isolamento e caracterização .....	27
2.3.2 Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> .....	29
2.3.3 Dados do genoma parcial de <i>Streptococcus</i> .....	38
2.3.4 Prospecção de peptídeos antimicrobianos .....	38
2.4 DISCUSSÃO .....	43
2.5 CONCLUSÕES .....	46
2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	47
<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>52</b>

3.1	INTRODUÇÃO.....	52
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	54
3.2.1	Genomas .....	54
3.2.2	Alinhamento e comparação dos genomas de <i>Streptococcus</i> do rúmen e de humanos.....	54
3.2.3	Avaliação do conteúdo gênico.....	55
3.3	RESULTADOS .....	55
3.3.1	Alinhamento e comparação dos genomas de <i>Streptococcus</i> do rúmen e de humanos.....	55
3.3.2	Genes envolvidos no metabolismo de carboidratos e na sobrevivência de <i>Streptococcus</i> em diferentes ambientes .....	58
3.3.3	Metabolismo de “Nitrogênio, aminoácidos e derivados” .....	61
3.3.4	Biossíntese de vitaminas e cofatores .....	62
3.3.5	Distribuição dos fatores de virulência .....	64
3.4	DISCUSSÃO .....	66
3.5	CONCLUSÕES .....	71
3.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	72
	MATERIAL SUPLEMENTAR .....	76

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 2

**Figura 1.** Diagrama de Venn representado a atividade antibacteriana *in vitro* dos isolados avaliados neste estudo contra diferentes bactérias indicadoras. Todas as bactérias indicadoras foram cultivadas em meio BHI a 37 °C e a presença de halos de inibição foi monitorada após incubação *overnight*. Indicadores: *Enterococcus faecalis* ATCC 4083 (EF), *Escherichia coli* ATCC 10536 (EC), *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (AS) e *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* ATCC 355 (LP). Meios de cultura: semi sintético (SS), mínimo (MM) e complexo (MC). 28

**Figura 2.** Relação filogenética de *S. lutetiensis* isolados do rúmen de bovinos (n=13). A árvore filogenética foi reconstruída usando o método neighbor-joining (NJ) com *bootstrap* maior que 50% com o programa RAxML BlackBox v7.7.1 e utilizando sequências de rDNA 16S de referência de diferentes espécies de *Streptococcus*. Os números de acesso GenBank das espécies são indicadas entre parênteses. A escala de barra representa três mudanças de nucleotídeos por 100 nucleotídeos analisados. Em negrito, estão destacados os isolados selecionados para sequenciamento do genoma completo. 29

**Figura 3.** Diagrama representativo da organização dos *clusters* de bacteriocinas encontrados nos cinco isolados ruminais provenientes desse estudo. Genes que codificam peptídeos preditos com função similar estão representados pelas cores: transportador ABC (verde), proteínas acessórias de transporte/efluxo (azul claro), regulador de resposta (roxo), bacteriocina classe II (vermelho), lantibiótico (amarelo), glicosil tranferase (laranja), imunidade (marrom), rSAM (amarelo claro), histidina quinase (rosa claro) peptidase (rosa), proteínas hipotéticas (cinza). Validação dos clusters pelo BLAST (Tabela S7). 40

**Figura 4.** Perfil de comparação dos isolados ruminais quanto à prospecção de sequências putativas de peptídeos antimicrobianos (AMPs). O perfil foi gerado usando informações disponíveis no banco de dados AMPLY. (A) Identificação de AMPs maduros em todo o genoma dos cinco isolados sequenciados neste trabalho. (B) Identificação de pré-peptídeos, sequências não modificadas e/ou clivadas presentes nos genomas completos dos cinco isolados sequenciados neste trabalho. 42

### Capítulo 3

**Figura 1.** Alinhamento dos cromossomos dos isolados de *Streptococcus* calculado por progressiveMAUVE. Alinhamento dos cromossomos dos isolados ruminais de *Streptococcus lutetiensis* (isolados 9, 11, 58, 59 e 80) (A), com *Streptococcus pyogenes* M1 GAS 9, *Streptococcus pasteurianus* ATCC 43144 e *Streptococcus gallolyticus* ATCC 43143, respectivamente (B). Os blocos acima ou abaixo do cromossomo (linha preta) correspondem à orientação *forward* ou *reverse*, respectivamente; as linhas, com a mesma cor dos blocos, conectam as regiões alinhadas e podem mostrar sintenia ou rearranjos. 57

**Figura 2.** *Heatmap* da anotação gênica das linhagens de *Streptococcus* isolados do ecossistema ruminal e de humanos. O agrupamento hierárquico (HCL) foi realizado

com os genes identificados nos 27 subsistemas identificados nas categorias SEED, usando o software MEV (Multi Experiment Viewer). A escala de cores no topo do *heatmap* permite a identificação do número de genes para cada microrganismo reportado. O agrupamento no topo da figura mostra a similaridade entre as espécies.

58

**Figura 3.** Número de genes envolvidos no metabolismo de carboidratos nos genomas de *Streptococcus* do rúmen e de humanos. A quantidade de genes presente em cada subsistema SEED foi gerada por meio da anotação funcional pelo software RAST. O tamanho da barra vertical é proporcional ao número de genes em cada microrganismo. Os genomas de *S. lutetienses* (isolados 9, 11, 58, 59 e 80) foram sequenciados nesse estudo. *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ATCC 43143 (NC\_017576.1), *S. pasteurianus* ATCC 43144 (AP012054.1) e *S. pyogenes* (NC\_002737) foram obtidos no banco de dados GenBank. (Distribuição dos genes específicos Tabela S2).

60

**Figura 4.** Número de genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio nos genomas de *Streptococcus* do rúmen e de humanos. A quantidade de genes presente em cada subsistema SEED foi gerada por meio da anotação funcional pelo software RAST. O tamanho da barra vertical é proporcional ao número de genes em cada microrganismo. Os genomas de *S. lutetienses* (isolados 9, 11, 58, 59 e 80) foram sequenciados nesse estudo. *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ATCC 43143 (NC\_017576.1), *S. pasteurianus* ATCC 43144 (AP012054.1) e *S. pyogenes* (NC\_002737) foram obtidos no GenBank. (Distribuição dos genes específicos Tabela S3).

62

**Figura 5** Número de genes envolvidos na biossíntese de vitaminas e cofatores nos genomas de *Streptococcus* do rúmen e de humanos. A quantidade de genes presente em cada subsistema SEED foi gerada por meio da anotação funcional pelo software RAST. O tamanho da barra vertical é proporcional ao número de genes em cada microrganismo. Os genomas de *S. lutetienses* (isolados 9, 11, 58, 59 e 80) foram sequenciados nesse estudo. *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ATCC 43143 (NC\_017576.1) , *S. pasteurianus* ATCC 43144 (AP012054.1) e *S. pyogenes* (NC\_002737) foram obtidos no GenBank. (Distribuição dos genes específicos Tabela S4).

63

**Figura 6.** Número de genes envolvidos na biossíntese dos possíveis fatores de patogenicidade nos genomas de *Streptococcus* do rúmen e de humanos. (A) Características específicas relacionadas ao número de genes envolvidos em virulência, defesa e invasão celular, (B) genes envolvidos em síntese de parede celular e cápsula. A quantidade de genes presente em cada subsistema SEED foi gerada por meio da anotação funcional pelo software RAST. O tamanho da barra vertical é proporcional ao número de genes em cada microrganismo. Os genomas de *S. lutetienses* (isolados 9, 11, 58, 59 e 80) foram sequenciados nesse estudo. *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ATCC 43143 (NC\_017576.1) , *S. pasteurianus* ATCC 43144 (AP012054.1) e *S. pyogenes* (NC\_002737) foram obtidos no GenBank. (Distribuição dos genes específicos Tabela S5A/B).

65

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 2

**Tabela 1:** Análise *in vitro* da atividade antibacteriana dos isolados avaliados neste estudo. Todas as bactérias indicadoras foram cultivadas em meio BHI a 37 °C e a presença de halos de inibição foi monitorada após incubação *overnight*.

27

**Tabela 2.** Caracterização morfológica e atividade antibacteriana *in vitro* dos isolados bacterianos obtidos do rúmen bovino. Foram listados apenas os isolados selecionados (n=106) que apresentaram atividade contra pelo menos dois dos 14 indicadores testados em três meios de cultivo diferentes (SS, MM, MC). Em negrito estão destacados os IDs dos 13 isolados que foram selecionados para caracterização posterior.

31

**Tabela 3.** Características e padrão de inibição *in vitro* dos 13 isolados selecionados contra os indicadores patogênicos e multirresistentes. Em destaque, os cinco isolados selecionados para sequenciamento completo do genoma.

37

**Tabela 4.** Principas características dos genomas parciais de bactérias ruminais sequenciados nesse estudo.

38

**Tabela 5.** Sequências de peptídeos preditos com possível atividade antimicrobiana.

41

### Capítulo 3

**Tabela 1.** Características dos genomas das linhagens clínicas de *S. pyogenes*, *S. gallolyticus* e *S. pasteurianus* usadas para análises de genômica comparativa com espécies de *Streptococcus* ruminais utilizadas neste estudo.

54

## RESUMO

OLIVEIRA, Isabela Maria Fernandes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2017. **Genômica comparativa e predição de peptídeos antimicrobianos em genomas de *Streptococcus* isolados do rúmen bovino** Orientador: Hilário Cuquetto Mantovani. Coorientadores: Mateus Ferreira Santana e Denise Mara Soares Bazzoli.

O ecossistema ruminal é composto por uma alta diversidade de microrganismos que desempenham papel fundamental na nutrição e saúde do hospedeiro. Estudos recentes tem sugerido que o rúmen representa uma fonte promissora de novos peptídeos antimicrobianos e resultados anteriores demonstraram que os peptídeos produzidos por algumas linhagens de *Streptococcus* possuem características úteis para o controle de patógenos. Neste trabalho, o objetivo foi isolar, caracterizar e sequenciar o genoma de bactérias produtoras de peptídeos antimicrobianos obtidas do rúmen de bovinos Nelore alimentados com forrageiras tropicais. Cinco isolados foram selecionados e identificados como *Streptococcus lutetiensis*. Após a anotação dos genomas foram utilizadas ferramentas computacionais para mineração de *clusters* de biossíntese de bacteriocinas para identificação e comparação de sequências de peptídeos antimicrobianos. Além disso, foi realizada uma análise comparativa com genomas de *Streptococcus* isolados de humanos, para avaliar diferenças quanto aos requerimentos nutricionais e potencial patogênico dessas espécies. Nas análises usando bancos de dados de acesso livre, os cinco genomas de *Streptococcus* apresentaram *clusters* putativos de biossíntese de bacteriocinas da classe II e apenas o *S. lutetienses* 59 apresentou um *cluster* associado com a biossíntese de lantibióticos (classe I). Em análises complementares usando a ferramenta protótipo AMPLY, foi observado um padrão de sequências homólogas a pre-peptídeos mais diverso do que o observado para peptídeos maduros, modificados pós traducionalmente. Nas análises comparativas dos cinco genomas ruminais com os genomas de *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ATCC 43143, *Streptococcus pyogenes* M1 GAS e *Streptococcus pasteurianus* ATCC 43144, foi observado que os genomas dos *Streptococcus* isolados de humanos apresentavam vias metabólicas mais completas para a utilização de carboidratos, o que não ocorreu para as vias de biossíntese de vitaminas e metabolismo de nitrogênio, nos quais os isolados do rúmen apresentaram mais genes associados com essas vias do anabolismo. Fatores de virulência foram identificados em todas as espécies analisadas, porém as espécies clínicas apresentaram maior quantidade e diversidade de genes relacionados com o fenótipo de patogenicidade, com destaque para

*S. pyogenes*. Os resultados demonstraram que todos os isolados de *Streptococcus* do rúmen são potenciais produtores de AMPs e indicaram que linhagens do complexo *Streptococcus bovis/equinus* representam uma fonte promissora de bacteriocinas das classes I e II.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Isabela Maria Fernandes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2017. **Comparative genomics and prediction of antimicrobial peptides in *Streptococcus* genomes isolated from the bovine rumen.** Adviser: Hilário Cuquetto Mantovani. Co-advisers: Mateus Ferreira Santana and Denise Mara Soares Bazzoli.

The ruminal ecosystem is composed of a high diversity of microorganisms that play a fundamental role in the nutrition and health of the host. Recent studies have suggested that the rumen also represents a promising source of new antimicrobial peptides and preliminary work demonstrated that the peptides produced by some strains of *Streptococcus* have useful characteristics for the control of pathogens. In this work, the objective was to isolate, characterise and sequence the genome of antimicrobial peptide-producing bacteria obtained from the rumen of Nelore cattle fed with tropical forages. Five isolates were selected and identified as *S. lutetiensis*. After the annotation of the genomes, computational tools were used to mine gene clusters probably associated with the biosynthesis of bacteriocins aiming to identify and compare new sequences of antimicrobial peptides. In addition, a comparative genomic analysis was carried out to evaluate the nutritional requirements and pathogenic potential of other *Streptococcus* isolated from humans. The five genomes of *Streptococcus* presented clusters involved in the biosynthesis of class II bacteriocins and only *S. lutetienses* 59 presented a cluster involved in the biosynthesis of lantibiotics (class I). Complementary analyses using the AMPLY prototype tool, allowed the identification of sequences that were homologous to prepeptides showing greater diversity than that observed for mature, posttranslationally modified peptides. In the comparative analyses of the five ruminal genomes with *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ATCC 43143, *Streptococcus pyogenes* M1 GAS and *Streptococcus pasteurianus* ATCC 43144, it was observed that the genomes from human isolates presented more complete metabolic pathways for carbohydrate metabolism, which was not observed for the pathways of vitamin biosynthesis and nitrogen metabolism, in which the rumen isolates presented more complete pathways. Virulence factors were identified in all species analysed, but the clinical species presented a greater quantity and diversity of genes related to the phenotype of pathogenicity, especially *S. pyogenes*. The results demonstrated that ruminal *Streptococcus* are potential producers of AMPs and indicated that strains of the *Streptococcus bovis/equinus* complex represent a promising source of class I and II bacteriocins.

## INTRODUÇÃO GERAL

A eficácia de várias classes de antibióticos para o tratamento de infecções em seres humanos e animais vem sendo reduzida ao longo dos anos. Estudos indicam que o uso indiscriminado de antibióticos na prática clínica e a criação intensiva de animais, associada ao uso de promotores de crescimento na alimentação animal, tem intensificado a seleção de microrganismos resistentes a antibióticos. Desse modo, o uso racional de antibióticos na agricultura e medicina e a descoberta de novos agentes antimicrobianos representam demandas urgentes e de interesse global.

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) com características bioquímicas diversas têm sido identificados em diferentes espécies de microrganismos, plantas e animais vertebrados e invertebrados, os quais demonstram atividade contra patógenos bacterianos incluindo linhagens multirresistentes a antibióticos. Dentre esses, estão as bacteriocinas, peptídeos sintetizados ribossomicamente por bactérias e Archaea, que além de apresentarem atividade antimicrobiana, podem atuar como peptídeos de sinalização em mecanismos de *quorum sensing* ou interagindo com células do sistema imune do hospedeiro.

A crescente disponibilidade de genomas microbianos sequenciados e o desenvolvimento de novas ferramentas de bioinformática têm possibilitado a identificação de genes ou vias biossintéticas associadas com a produção de peptídeos antimicrobianos em diferentes organismos e ecossistemas e a predição de sequências de peptídeos com potencial atividade antimicrobiana. Recentemente, o ecossistema ruminal tem sido investigado como uma fonte ainda pouco explorada de peptídeos antimicrobianos produzidos por microrganismos procariotos e eucariotos.

Estudos anteriores demonstraram que a produção de peptídeos antimicrobianos pode ser uma característica ecológica vantajosa para as bactérias do rúmen, sendo que vários gêneros produtores dessas moléculas já foram isolados, incluindo *Streptococcus*, *Ruminococcus*, *Enterococcus* e *Butyrivibrio*. Tradicionalmente, a identificação de peptídeos antimicrobianos produzidos por bactérias do rúmen têm sido feita utilizando ensaios de inibição direta contra organismos alvo. Porém, poucos peptídeos foram identificados por meio de métodos dependentes de cultivo e um número ainda menor foi caracterizado bioquimicamente. Além disso, poucos estudos têm utilizado estratégias

computacionais (*in silico*) para investigar a presença de genes de biossíntese de AMPs em genomas de microrganismos ruminais.

O uso de análises *in silico* para investigar sequências de interesse e comparar genomas bacterianos tem sido uma estratégia promissora no estudo de novos agentes antimicrobianos. A comparação de genomas auxilia na compreensão do processo evolutivo nos diferentes níveis taxonômicos e possibilita avaliar o potencial de adaptação de microrganismos ao ambiente, identificar diferenças genéticas e requerimentos nutricionais entre linhagens relacionadas, além de diferenciar o potencial patogênico de espécies distintas.

Neste trabalho, bactérias ruminais com atividade antimicrobiana contra patógenos humanos e animais foram isoladas e a presença de sequências codificadoras de peptídeos antimicrobianos foi investigada nos genomas desses isolados. Análises de genômica comparativa foram realizadas para investigar diferenças relacionadas com o perfil de atividade antimicrobiana dos isolados, distribuição de fatores de virulência, além de características metabólicas relevantes para a colonização do ecossistema ruminal.

# CAPÍTULO 1

## 1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1.1 Doenças infecciosas e resistência a antibióticos

O reconhecimento e disseminação de patógenos multirresistentes representa um risco para a saúde pública, bem como uma ameaça para o sucesso do tratamento de infecções graves e profundas (Karageorgos *et al.*, 2016). A resistência antimicrobiana não é um fenômeno recente, mas é atualmente considerada uma questão crítica na prática clínica. Ao longo de várias décadas, em diferentes graus, as bactérias que causam infecções, desenvolveram resistência a cada novo antibiótico, e esse problema evoluiu para se tornar uma ameaça à saúde em todo o mundo (World Health Organisation, 2015).

Considerando que o consumo mundial de drogas antimicrobianas utilizadas em animais produtores de alimentos vem aumentando nas últimas décadas, assim como a interação entre animais e seres humanos, a propagação da resistência a antibióticos é tratada como um problema para a saúde humana em nível global (Toutain *et al.*, 2016). Em relação ao risco para a saúde pública, os alimentos têm sido considerados como uma importante via por meio da qual os seres humanos podem ser expostos a bactérias resistentes aos antimicrobianos. Além disso, para determinados organismos como *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Enterococcus faecium*, há uma preocupação crescente quanto ao risco de contaminação por contato direto com animais (World Health Organisation, 2015).

Dados do FDA (U.S. Food and Drug Administration, 2012), revelaram que oitenta por cento dos antibióticos vendidos nos EUA tem sido destinados para uso em animais. Muitos desses medicamentos, por exemplo, penicilina e tetraciclina pertencem às mesmas classes de antibióticos utilizadas na medicina humana, sendo atualmente, alvo de normativas que visam regular o uso desses antimicrobianos (Union Of Concerned Scientists, 2016). Pesquisas realizadas pelo Sistema de Vigilância da Resistência Antimicrobiana Nacional dos EUA (NARMS) indicam que carne de varejo são frequentemente contaminadas com espécies de *Campylobacter*, *Salmonella*, *Enterococcus* e de *Escherichia coli* (Waters *et al.*, 2011), agentes patogênicos de grande

relevância para a saúde humana. Linhagens de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) (Bakri *et al.*, 2016) e Enterobacteriaceae resistentes à carbapenêmicos (ERC) também foram classificadas como ameaças à saúde humana devido à resistência a praticamente todos os antibióticos utilizados na terapia clínica (Yamamoto & Pop-Vicas, 2014).

Como consequência desses problemas, tem aumentado o interesse pela descoberta e desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos que podem ser usados para fins terapêuticos (Li *et al.*, 2012). Diversas alternativas vêm sendo investigadas incluindo peptídeos antimicrobianos produzidos em bactérias, insetos, plantas e vertebrados, que possam atuar contra diferentes tipos de agentes infecciosos. Em mamíferos, estes peptídeos podem servir para proteção contra bactérias, vírus e fungos. Peptídeos antimicrobianos bioativos podem atuar na neutralização de endotoxinas, na atividade quimiotática e de imunomoduladores, na indução da angiogênese e da cicatrização (Guaní-Guerra *et al.*, 2010, da Silva & Machado, 2012).

Os peptídeos antimicrobianos, a exemplo das bacteriocinas, representam uma alternativa potencial para atender a demanda por agentes antimicrobianos efetivos contra patógenos bacterianos. As bacteriocinas têm sido utilizadas em várias aplicações, sendo úteis para prolongar a vida de prateleira de alimentos, controlar patógenos humanos e animais e modular processos fermentativos (Balciunas *et al.*, 2013, Cotter *et al.*, 2013).

### **1.1.2 Peptídeos antimicrobianos produzidos por bactérias ruminais**

O rúmen é colonizado por populações interdependentes de bactérias, Archaea, protozoários, fungos e vírus. No entanto, as bactérias representam o grupo de microrganismos mais abundante e diverso do rúmen, compreendendo entre  $10^{10}$  e  $10^{11}$  células por grama de conteúdo ruminal com, aproximadamente, trezentas e cinquenta espécies diferentes (Creevey *et al.*, 2014). A complexidade de substratos, nichos para adesão e fluxo da fase líquida e sólida do ecossistema ruminal, promove alta diversidade e densidade populacional, gerando oportunidades constantes de interações ecológicas, como sinergismo, competição por substrato e antagonismo entre os microrganismos (Kamra, 2005). Assim, sugere-se que a capacidade de produzir compostos antimicrobianos como as bacteriocinas representa uma estratégia competitiva que pode ser vantajosa para a colonização e sobrevivência no rúmen (Teather *et al.*, 1999).

Estudos anteriores indicaram que a frequência de isolados produtores de bacteriocinas obtidos do ambiente está entre 1% e 10%. A síntese de bacteriocinas tem sido reportada entre diferentes espécies de bactérias do ecossistema ruminal, com frequência geralmente superior a 20%. Análises *in vitro* indicaram que até 50% dos isolados de bactérias ruminais apresentavam atividade antagonista contra outras bactérias (Teather *et al.*, 1999, Mantovani *et al.*, 2001).

Dentre os diferentes gêneros de bactérias ruminais em que foi detectada a produção de peptídeos antimicrobianos, *Ruminococcus* (Odenyo *et al.*, 1994, Xiao *et al.*, 2004), *Butyrivibrio* (Teather *et al.*, 1999, Rychlik & Russell, 2002), *Enterococcus* (Nigutova *et al.*, 2007) e *Streptococcus* (Mantovani *et al.*, 2001, Whitford *et al.*, 2001), são os gêneros mais recorrentes. Espécies menos abundantes como *Lactobacillus fermentus* apresentou atividade inibitória contra *Streptococcus bovis* (Wells *et al.*, 1997) e uma linhagem bacteriocinogênica de *Bacillus licheniformis* foi reportada em estudo com isolados bacterianos obtidos do rúmen de búfalo (Pattnaik *et al.*, 2001). Além disso, *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>, bactéria ruminal que produz uma substância semelhante a bacteriocina, inibiu bactérias ruminais como *Prevotella bryantii* e *Butyrivibrio fibrisolvens* e também *Salmonella* e *E. coli* isoladas de aves domésticas (Čepeljnik *et al.*, 2003).

Apesar dos esforços para caracterizar bacteriocinas produzidas por bactérias ruminais, até agora apenas três lantibióticos, quatro bacteriocinas da classe II e duas bacteriocinas da classe III foram identificados ou pelo menos parcialmente caracterizadas nos níveis bioquímicos e genéticos entre estirpes de bactérias ruminais. Os lantibióticos incluem a butirivibriocina OR79A (Kalmokoff *et al.*, 1999), a butirivibriocina AR10 (Kalmokoff & Teather, 1997) e a bovicina HC5 (Mantovani *et al.*, 2001). As bacteriocinas da classe II foram denominadas lichenina (Pattnaik *et al.*, 2001), bovicina 255 (Whitford *et al.*, 2001), enterocina BC25 (Morovský *et al.*, 2001) e enterocina CCM4231 (Lauková & Czikková, 1998). As bacteriocinas da classe III são representadas pela enterolisina e albusina B (Chen *et al.*, 2004).

Em um trabalho anterior, Azevedo e colaboradores (2015), avaliaram a distribuição e a diversidade de *clusters* gênicos de bacteriocinas em sequências completas e parciais do genoma de 224 bactérias e cinco Archaea ruminais visando determinar a distribuição e diversidade de grupos de genes de bacteriocinas. Foram identificados 46 *clusters* de genes de bacteriocinas em 33 estirpes de bactérias ruminais. Vinte *clusters* gênicos foram relacionados com a biossíntese de lantipeptídeos, 11

*clusters* foram associados com a produção de sactipeptídeo, sete foram associados com a produção de bacteriocinas da classe II e genes de oito *clusters* foram associados com bacteriocinas da classe III (Azevedo *et al.*, 2015). Naquele trabalho, foram identificados genes de biossíntese de bacteriocinas em espécies que não haviam sido previamente descritas como produtoras de peptídeos antimicrobianos. Esses resultados indicaram que a mineração *in silico* de genomas bacterianos da microbiota ruminal pode contribuir para a descoberta de agentes antimicrobianos com potencial para aplicação no controle de patógenos (Azevedo *et al.*, 2015).

### 1.1.3 Bacteriocinas

As bacteriocinas são uma classe de peptídeos com ação antimicrobiana que apresentam diversidade em sua composição química, estrutural e funcional (Willey & Van Der Donk, 2007). Além disso, as bacteriocinas estão distribuídas entre espécies de bactérias e arqueas (Morton *et al.*, 2015), diferindo em tamanho, sequência de aminoácidos e mecanismos de ação. Alguns desses peptídeos exibem atividade bactericida ou bacteriostática, formando poros em membranas de células sensíveis, inibindo a polimerização do peptidoglicano, ou a síntese de proteínas e de ácidos nucleicos (Paiva *et al.*, 2011). As estruturas das bacteriocinas revelaram muitos peptídeos podem ser agrupados na classe de polipeptídios modificados pós-traducionalmente. Muitas bacteriocinas tem origem como peptídeos precursores e posteriormente sofrem alterações que resultam em suas formas biologicamente ativas (Rea *et al.*, 2011). Normalmente, as bacteriocinas são sintetizadas como um pré-peptídeo biologicamente inativo contendo uma sequência líder na região N-terminal (Klaenhammer, 1993). A sequência líder auxilia o reconhecimento do pré-peptídeo pelas enzimas de maturação e transporte e protege a estirpe produtora, mantendo a bacteriocina inativa até ser secretada no meio extracelular (van der Meer *et al.*, 1994, Perez *et al.*, 2014). Embora as bacteriocinas sejam estruturalmente diversas, os genes necessários para a biossíntese são geralmente conservados entre diferentes espécies de bactérias (Morton *et al.*, 2015).

Quatro classes principais foram propostas para classificar as bacteriocinas (Cotter *et al.*, 2005). A classe I contém peptídeos antimicrobianos modificados pós-traducionalmente, tais como, sactipeptídeos, lantipeptídeos e peptídeos laço, que diferem em suas estruturas moleculares, mecanismos de ação e nos aparatos enzimáticos envolvidos na modificação dos peptídeos precursores (Arnison *et al.*, 2013). Os

lantibióticos, por exemplo, apresentam de 19-38 aminoácidos e são caracterizados pelas modificações pós-traducionais que ocorrem durante o processo de biossíntese (Willey & Van Der Donk, 2007). Os lantibióticos atuam principalmente, formando poros na membrana citoplasmática que dissipam o gradiente eletroquímico através da membrana. Além disso, podem se ligar a moléculas precursoras da biossíntese de peptídeo glicano (a exemplo do lipídeo II) na membrana plasmática, inibindo a síntese da parede celular (Dischinger *et al.*, 2014).

Bacteriocinas da classe II consistem em peptídeos pequenos (de 4 a 6 kDa) e termoestáveis, sendo sintetizadas ribossomicamente como pré-peptídeos e não sofrem modificação pós-traducional, exceto a clivagem do peptídeo durante o transporte para fora da célula (Nes *et al.*, 2007). Está bem estabelecido que as bacteriocinas de classe II atuam na formação de poros ou interferem na integridade da membrana citoplasmática, causando despolarização do gradiente iônico de células sensíveis, com consequente perda de metabólitos intracelulares como ATP e K<sup>+</sup> (Cotter *et al.*, 2005). Essas bacteriocinas são subdivididas em cinco subclasses: IIa, IIb, IIc, IId e IIe (Nes *et al.*, 2007, Kjos *et al.*, 2011). A subclasse IIa são bacteriocinas como a pediocina (pediocina PA-1, mesentericina Y105, enterocina P), que apresentam uma sequência consenso N-terminal (YGNGVxCxxxxCxVxWxxA, onde x representa qualquer aminoácido) (Kjos *et al.*, 2011). A subclasse IIb corresponde a bacteriocinas com dois peptídeos que atuam sinergicamente e apresentam atividade ótima dependente da ação de ambos os peptídeos (lactococina G, enterocina L50, plantaricina S) (Soliman *et al.*, 2011). A subclasse IIc apresenta anéis em suas estrutura (lactociclina Q, garvicina ML) (Nes *et al.*, 2007). A subclasse IId consiste em um peptídeo linear como as Lactococinas A e B e por fim, a subclasse IIe é formada pela degradação de proteínas maiores (Kjos *et al.*, 2011).

As bacteriocinas da classe III consistem em proteínas termolábeis com mais de 10 kDa, geralmente referidas como bacteriolisinas (Cotter *et al.*, 2005). Essas proteínas possuem domínio catalítico na região N-terminal que apresenta homologia a endopeptidases. O domínio C-terminal parece estar envolvido na especificidade da proteína com as células alvo, conforme o que foi reportado para zoocina A, uma das mais bem caracterizadas bacteriolisinas (Nilsen *et al.*, 2003, Cotter *et al.*, 2005). A zoocina A foi caracterizada como uma D-alanyl-L-alanine endopeptidase que possui atividade contra outros estreptococos catalisando a clivagem das ligações cruzadas do peptídeo glicano da célula alvo (Simmonds *et al.*, 1996). Millericina B é uma mureína

hidrolase cuja expressão depende de três genes, incluindo um precursor (*milB*), uma proteína de imunidade (*milF*) e uma proteína de transporte (*milT*). Estudo anterior indicou que o mecanismo de ação também envolve a clivagem do peptidoglicano (Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016). As bacteriocinas cíclicas modificadas pós-traducionalmente, que foram previamente agrupados no subtipo IIc (Cotter *et al.*, 2005), são geralmente antimicrobianos de largo espectro e são conhecidas pelo seu pH e estabilidade térmica, bem como pela sua resistência a muitas enzimas proteolíticas (Gabrielsen *et al.*, 2014). No entanto, esta questão tem sido debatida, e alguns pesquisadores defendem que essas bacteriocinas deve ser classificadas em um novo grupo, isto é, classe IV ou V bacteriocinas (Maqueda *et al.*, 2008, Gabrielsen *et al.*, 2014). As bacteriocinas circulares são claramente distintas de outras bacteriocinas Gram-positivas e são suficientemente homogêneas para serem consideradas como um grupo à parte (Gabrielsen *et al.*, 2014). São sintetizadas como precursores lineares, contendo uma sequência líder de dimensão variável que é clivada durante a maturação (Grande Burgos *et al.*, 2014). Os peptídeos circulares maduros variam desde 58 a 70 resíduos de aminoácidos, com aproximadamente 5,6 a 7,2 kDa. Foram identificadas bacteriocinas circulares produzidas por bactérias Gram-positivas do filo Firmicutes, principalmente bactérias do ácido láctico, a exemplo da enterocina AS-48 (Gabrielsen *et al.*, 2014, Grande Burgos *et al.*, 2014).

#### **1.1.4 Identificação de genes de bacteriocinas por meio de análises *in silico***

Muitos estudos de identificação de peptídeos antimicrobianos em bactérias baseiam-se em métodos dependentes de cultivo e ensaios *in vitro* para avaliar a atividade antimicrobiana dos isolados potencialmente produtores desses compostos (Perez *et al.*, 2014). No entanto, análises de mineração de dados genômicos e a disponibilidade de novas ferramentas de bioinformática têm resultado na descoberta de novos peptídeos antimicrobianos produzidos por diferentes grupos de bactérias (Flaherty *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, dados de sequenciamento de nova geração de vários genomas bacterianos e metagenomas de diferentes ecossistemas têm sido disponibilizados em bancos de dados de acesso livre, como o National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>) e o Joint Genome Institute (JGI) (<http://genome.jgi.doe.gov/>). Esses dados podem ser utilizados para mineração de regiões conservadas e predição de proteínas de interesse, sendo possível inferir funções

e estruturas, bem como estimar relações filogenéticas entre proteínas e genes de interesse (Wilkinson & Micklefield, 2007).

Muitas ferramentas online têm sido desenvolvidas para auxiliar na identificação, caracterização e classificação de peptídeos antimicrobianos, entre elas as bacteriocinas (Velásquez & Van der Donk, 2011). O algoritmo AntiSMASH e o *Antimicrobial Peptide Database* (APD) são algumas das ferramentas mais utilizadas para análise de sequências de peptídeos antimicrobianos e/ou de metabólitos secundários em genomas microbianos (Medema *et al.*, 2011). Análises de sequências de aminoácidos oriundas de diferentes fontes biológicas (variando de bactérias, plantas e animais) utilizando ferramentas computacionais têm possibilitado classificar, prever e desenvolver novos peptídeos antimicrobianos (AMPs) (Wang *et al.*, 2009, Wang *et al.*, 2016).

Além disso, nos últimos anos alguns algoritmos destinados especificamente à mineração de genes de bacteriocinas foram desenvolvidos e aperfeiçoados. O software BAGEL3 usa três bancos de dados diferentes contendo sequências de bacteriocinas e outros peptídeos modificados ou não após a tradução (van Heel *et al.*, 2013). O algoritmo BACTIBASE utiliza propriedades físico-químicas calculadas ou previstas de bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas para prever peptídeos antimicrobianos em genomas bacterianos (Hammami *et al.*, 2010).

Recentemente, utilizando uma abordagem *in silico*, *clusters* de bacteriocinas foram identificados em genomas de bactérias isoladas do trato gastrointestinal (GIT) humano (Walsh *et al.*, 2015). Walsh e colaboradores (2015) usaram o algoritmo BAGEL3 para identificar 217 potenciais *clusters* de bacteriocinas em isolados do trato gastrointestinal humano, a partir de 130 bactérias, usando 382 genomas de referência sequenciados no Projeto Microbioma Humano (HMP) para comparação. Cada um dos *clusters* relacionados a bacteriocinas foram anotados e avaliados, dentre os grupos de microrganismos tinham membros de Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria e Fusobacteria. Proteínas com tamanho > 10 kDa, anteriormente denominadas bacteriolisinas, foi a classe de bacteriocina mais comumente identificada, seguido por lantibióticos e sactipeptídeos (Walsh *et al.*, 2015).

Letzel *et al.*, (2014) investigaram mais de 200 genomas completos de bactérias anaeróbias, cujo potencial para codificar peptídeos não havia sido avaliado. Usando diferentes ferramentas de bioinformática, incluindo os algoritmos antiSMASH, BAGEL, BACTIBASE e BLAST os autores relataram vários genes putativos de biossíntese de peptídeos antimicrobianos em alguns filos bacterianos. Além disso, a

análise dos *clusters* gênicos sugeriu que os peptídeos poderiam ser sintetizados isoladamente ou expressos junto com metabólitos secundários. Entre os genomas analisados, vários genes putativos estavam relacionados com a biossíntese de peptídeos ainda não caracterizados, enquanto outros apresentavam similaridade com lantipeptídeos da classe II, peptídeos cíclicos e lactococina 972 (Letzel *et al.*, 2014).

A fim de identificar *clusters* de biossíntese de lantibióticos, Singh e Sareen (2014) realizaram um *screening* para homólogos do gene LanT, envolvidos com a secreção de lantibióticos pela membrana citoplasmática. A estratégia resultou na identificação de 54 linhagens que codificam novos homólogos da proteína de transporte de haloduracina (HalT) nos genomas analisados. Desses, 24 novos *clusters* que codificam genes precursores de peptídeos foram submetidos a novas análises para genes de enzimas modificação, imunidade e proteínas de *quorum sensing* e oito novos *clusters* de lantibióticos de dois componentes foram identificados nos bancos de dados genômicos (Singh & Sareen, 2014).

A mineração de genomas de bactérias ruminais, realizada por Zhao e colaboradores (2016) revelou *clusters* gênicos de lantipeptídeos codificados no genoma de *Ruminococcus flavefaciens* FD1. Os lantipeptídeos de *R. flavefaciens* FD1 representam foram distintos de outros lantipeptídeos de dois componentes, pelo fato de serem constituídos por um  $\alpha$ -peptídeo altamente conservado e um conjunto diversificado de oito  $\beta$ -peptídeos que agem em sinergia, porém o mecanismo de ação (relacionado com a formação de poros na membrana) não foi completamente elucidado (Zhao & van der Donk, 2016).

Esses resultados indicam que o uso de ferramentas computacionais para mineração de *clusters* de biossíntese de bacteriocinas permite a identificação e comparação de novas sequências de peptídeos antimicrobianos com base em modelos biológicos preditos. Dessa forma, estratégias *in silico* podem ser utilizadas para identificar genes relacionados à biossíntese de bacteriocinas em linhagens de bactérias ruminais que ainda não foram investigadas quanto à capacidade de produzir AMPs.

### **1.1.5 Genômica comparativa de *Streptococcus***

Com os avanços nas tecnologias de sequenciamento e análises computacionais, a aplicação de ferramentas genômicas tem ampliado as fronteiras de estudo na área de ecologia microbiana (Xu, 2006). O sequenciamento de genomas completos tem gerado novas descobertas sobre a evolução de diferentes gêneros de bactérias e contribuído

para o entendimento dos mecanismos de adaptação patógeno-hospedeiro, possibilitando o desenvolvimento de estratégias para prevenção e tratamento de algumas enfermidades (Gao *et al.*, 2014).

Nesse contexto, a genômica comparativa tem sido usada para investigar variações intraespecíficas entre espécies relacionadas ou não filogeneticamente (Gao *et al.*, 2014, Borst *et al.*, 2015). Análises do conteúdo e organização gênica permitem identificar similaridades e diferenças entre dois ou mais genomas, incluindo redução, rearranjo, duplicação e aquisição de novos genes por meio de transferência horizontal de genes. Esses estudos indicam que uma estirpe pode não ser representativa de outros membros de uma mesma espécie (Papadimitriou *et al.*, 2014). Com base nisso, Gao *et al.*, 2014, utilizaram abordagens de genômica comparativa, para investigar a evolução do gênero *Streptococcus*. Foram avaliados a variabilidade dos genomas, estrutura da população, filogenia e distribuição de fatores de virulência em 138 genomas de espécies desse gênero. A análise da estrutura populacional indicou que todas as espécies de *Streptococcus* se ramificaram em duas populações distintas dentro do gênero e que a distribuição dos fatores de virulência não apresenta padrões óbvios entre os grupos de espécies. Entretanto, a evolução de alguns fatores comuns é congruente com a evolução dos grupos, de acordo com a inferência filogenética (Gao *et al.*, 2014).

*Streptococcus* compreende um gênero de bactérias comensais com grande importância industrial e clínica para humanos e animais (Jans *et al.*, 2015). O complexo *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* atualmente consiste em um grupo de engloba sete espécies do gênero (Jans *et al.*, 2015) que se destacam pela alta capacidade adaptativa em diferentes ecossistemas, resistência a antibióticos e ao sistema imune do hospedeiro (Gao *et al.*, 2014). Além disso, algumas espécies têm sido associadas com infecções que elevam as taxas de morbidade e mortalidade em pacientes internados, como é o caso de *S. gallolyticus*. Essa bactéria é comumente associada à endocardite infecciosa (IE), sendo encontrada no trato gastrointestinal de uma pequena proporção de seres humanos (2.5%–15%), aves e ruminantes (Danne *et al.*, 2011). *S. pasteurinus* tem sido associado a carcinoma, endocardites e alguns casos de meningite (Sturt *et al.*, 2010) e *S. infantarius* pode causar a morte de bovinos por septicemia e toxemia (Clarke *et al.*, 2016), destacando a importância de estratégias eficazes para o controle desse grupo de microrganismos.

Os *Streptococcus* do grupo A de Lancefield (GAS), são bactérias que causam diferentes tipos de infecções em humanos, sendo algumas de baixa severidade e outras

altamente danosas ao hospedeiro, como a faringite e/ou amigdalite, infecções cutâneas (incluindo impetigo, erisipela e outras formas de pioderma), febre reumática aguda (ARF), escarlatina, glomerulonefrite (PSGN), síndrome de choque tóxico e fascite necrozante (NF) (Musser & Shelburne, 2009, Carroll *et al.*, 2011). *S. pyogenes* é uma espécie do grupo A de estreptococos, que se destaca por estar associada com infecções severas em humanos (Carroll *et al.*, 2011). Análises genômicas e moleculares de *S. pyogenes* têm sido utilizadas para identificar fatores de virulência envolvidos em processos de adesão e colonização tecidual e na disseminação do patógeno pelo corpo humano (Beye *et al.*, 2017). Em estudo recente, Beye et al. 2017, identificaram e sequenciaram genes que constituem o viruloma de nove *S. pyogenes* associados a faringite e infecções de pele. Para a maior parte dos isolados, os genes são conservados entre as linhagens, como a proteína antifagocítica M (*emm*). No entanto, alguns genes carregados por fagos e profagos são exclusivos de algumas linhagens, a exemplo do gene *sic*, um inibidor de proteínas do complemento, presente em apenas dois isolados. Os genes que codificam algumas exotoxinas, incluindo streptolisina S (*sls*) e streptolisina O (*slo*), foram altamente conservados entre todos isolados (Beye *et al.*, 2017).

Neste trabalho foi feita a comparação dos genomas completos de cinco isolados de *Streptococcus lutetiensis* obtidos do rúmen bovino, com o objetivo de identificar diferenças associadas com a atividade antimicrobiana *in vitro* desses isolados. Além disso, buscou-se identificar diferenças quanto às exigências nutricionais e à presença de fatores de virulência em comparação com *S. gallolyticus*, *S. pasteurianus* e *S. pyogenes*. A análise de genômica comparativa revelou que as diferentes espécies de *Streptococcus* compartilham a maior parte do genoma analisado, diferindo na abundância de genes envolvidos em cada via metabólica. Os genomas dos três isolados clínicos apresentaram maior número de genes envolvidos com o metabolismo de carboidratos quando comparado aos genomas dos cinco isolados de rúmen. *S. pyogenes* apresentou maior número de fatores de virulência em relação às demais espécies, porém o número de genes envolvidos com o metabolismo de nitrogênio e biossíntese de vitaminas foi menor do que o observado nos isolados do rúmen.

## 1.2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvarez-Sieiro P, Montalbán-López M, Mu D & Kuipers OP (2016) Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied microbiology and biotechnology* **100**: 2939-2951.

Arnison PG, Bibb MJ, Bierbaum G, Bowers AA, Bugni TS, Bulaj G, Camarero JA, Campopiano DJ, Challis GL & Clardy J (2013) Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Natural product reports* **30**: 108-160.

Azevedo AC, Bento CB, Ruiz JC, Queiroz MV & Mantovani HC (2015) Distribution and genetic diversity of bacteriocin gene clusters in rumen microbial genomes. *Applied and environmental microbiology* **81**: 7290-7304.

Bakri FG, Hadidy AM, Hadidi F, Ryalat N, Saket L, Shurbasi N & Melhem J (2016) Bilateral primary psoas abscesses due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a neutropenic patient: a case report. *Journal of medical case reports* **10**: 12.

Balciunas EM, Martinez FAC, Todorov SD, de Melo Franco BDG, Converti A & de Souza Oliveira RP (2013) Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. *Food Control* **32**: 134-142.

Beye M, El Karkouri K, Labas N, Raoult D & Fournier P-E (2017) Genomic analysis of a *Streptococcus pyogenes* strain causing endocarditis in a child. *New microbes and new infections* **17**: 1-6.

Borst LB, Suyemoto MM, Scholl EH, Fuller FJ & Barnes HJ (2015) Comparative genomic analysis identifies divergent genomic features of pathogenic *Enterococcus cecorum* including a type IC CRISPR-Cas system, a capsule locus, an epa-like locus, and putative host tissue binding proteins. *PloS one* **10**: e0121294.

Carroll RK, Beres SB, Sitkiewicz I, Peterson L, Matsunami RK, Engler DA, Flores AR, Sumby P & Musser JM (2011) Evolution of diversity in epidemics revealed by analysis of the human bacterial pathogen group A *Streptococcus*. *Epidemics* **3**: 159-170.

Čepeljnik T, Zorec M, Kostanjšek R, Nekrep F & Marinšek-Logar R (2003) *IsPseudobutyrvibrio xylanivorans* strain Mz5T suitable as a probiotic? An *In Vitro* study. *Folia microbiologica* **48**: 339-345.

Chen J, Stevenson DM & Weimer PJ (2004) Albusin B, a bacteriocin from the ruminal bacterium *Ruminococcus albus* 7 that inhibits growth of *Ruminococcus flavefaciens*. *Applied and environmental microbiology* **70**: 3167-3170.

Clarke LL, Fathke RL, Sanchez S & Stanton JB (2016) *Streptococcus bovis*/S. *equinus* complex septicemia in a group of calves following intramuscular vaccination. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1040638716648364.

- Cotter PD, Hill C & Ross RP (2005) Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology* **3**: 777-788.
- Cotter PD, Ross RP & Hill C (2013) Bacteriocins—a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology* **11**: 95-105.
- Creevey CJ, Kelly WJ, Henderson G & Leahy SC (2014) Determining the culturability of the rumen bacterial microbiome. *Microbial biotechnology* **7**: 467-479.
- da Silva FP & Machado MCC (2012) Antimicrobial peptides: clinical relevance and therapeutic implications. *Peptides* **36**: 308-314.
- Danne C, Entenza JM, Mallet A, Briandet R, Débarbouillé M, Nato F, Glaser P, Jouvion G, Moreillon P & Trieu-Cuot P (2011) Molecular characterization of a *Streptococcus gallolyticus* genomic island encoding a pilus involved in endocarditis. *Journal of Infectious Diseases* **204**: 1960-1970.
- Dischinger J, Chipalu SB & Bierbaum G (2014) Lantibiotics: promising candidates for future applications in health care. *International Journal of Medical Microbiology* **304**: 51-62.
- Flaherty RA, Freed SD & Lee SW (2014) The wide world of ribosomally encoded bacterial peptides. *PLoS Pathog* **10**: e1004221.
- Gabrielsen C, Brede DA, Nes IF & Diep DB (2014) Circular bacteriocins: biosynthesis and mode of action. *Applied and environmental microbiology* **80**: 6854-6862.
- Gao X-Y, Zhi X-Y, Li H-W, Klenk H-P & Li W-J (2014) Comparative genomics of the bacterial genus *Streptococcus* illuminates evolutionary implications of species groups. *PloS one* **9**: e101229.
- Grande Burgos MJ, Pulido RP, del Carmen López Aguayo M, Gálvez A & Lucas R (2014) The cyclic antibacterial peptide enterocin AS-48: isolation, mode of action, and possible food applications. *International journal of molecular sciences* **15**: 22706-22727.
- Guaní-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes SO & Terán LM (2010) Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clinical Immunology* **135**: 1-11.
- Hammami R, Zouhir A, Le Lay C, Hamida JB & Fliss I (2010) BACTIBASE second release: a database and tool platform for bacteriocin characterization. *Bmc Microbiology* **10**: 22.
- Jans C, Meile L, Lacroix C & Stevens MJ (2015) Genomics, evolution, and molecular epidemiology of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex (SBSEC). *Infection, Genetics and Evolution* **33**: 419-436.
- Kalmokoff M & Teather R (1997) Isolation and characterization of a bacteriocin (Butyrvibriocin AR10) from the ruminal anaerobe *Butyrvibrio fibrisolvens* AR10:

evidence in support of the widespread occurrence of bacteriocin-like activity among ruminal isolates of *B. fibrisolvens*. *Applied and environmental microbiology* **63**: 394-402.

Kalmokoff M, Lu D, Whitford M & Teather R (1999) Evidence for Production of a New Lantibiotic (Butyrivibriocin OR79A) by the Ruminal Anaerobe *Butyrivibrio fibrisolvens* OR79: Characterization of the Structural Gene Encoding Butyrivibriocin OR79A. *Applied and environmental microbiology* **65**: 2128-2135.

Kamra DN (2005) Rumen microbial ecosystem. *Current science* **89**: 124-135.

Karageorgos SA, Miligkos M, Dakoutrou M & Tsioutis C (2016) Clinical Effectiveness, Safety Profile, and Pharmacokinetics of Daptomycin in Pediatric Patients: A Systematic Review. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society* **5**: 446-457.

Kjos M, Borrero J, Opsata M, Birri DJ, Holo H, Cintas LM, Snipen L, Hernandez PE, Nes IF & Diep DB (2011) Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Microbiology* **157**: 3256-3267.

Klaenhammer TR (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS microbiology reviews* **12**: 39-85.

Lauková A & Czikková S (1998) Inhibition effect of enterocin CCM 4231 in the rumen fluid environment. *Letters in applied microbiology* **26**: 215-218.

Letzel A-C, Pidot SJ & Hertweck C (2014) Genome mining for ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs) in anaerobic bacteria. *BMC genomics* **15**: 983.

Li Y, Xiang Q, Zhang Q, Huang Y & Su Z (2012) Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides* **37**: 207-215.

Mantovani HC, Kam DK, Ha JK & Russell JB (2001) The antibacterial activity and sensitivity of *Streptococcus bovis* strains isolated from the rumen of cattle. *FEMS Microbiology Ecology* **37**: 223-229.

Maqueda M, Sánchez-Hidalgo M, Fernández M, Montalbán-López M, Valdivia E & Martínez-Bueno M (2008) Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *FEMS microbiology reviews* **32**: 2-22.

Medema MH, Blin K, Cimermancic P, de Jager V, Zakrzewski P, Fischbach MA, Weber T, Takano E & Breitling R (2011) antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic acids research* **39**: W339-W346.

Morovský M, Pristaš P, Javorský P, Nes IF & Holo H (2001) Isolation and characterization of enterocin BC25 and occurrence of the ent A gene among ruminal Gram-positive cocci. *Microbiological research* **156**: 133-138.

Morton JT, Freed SD, Lee SW & Friedberg I (2015) A large scale prediction of bacteriocin gene blocks suggests a wide functional spectrum for bacteriocins. *BMC bioinformatics* **16**: 381.

Musser JM & Shelburne SA (2009) A decade of molecular pathogenomic analysis of group A Streptococcus. *The Journal of clinical investigation* **119**: 2455-2463.

Nes IF, Yoon S & Diep DB (2007) Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: a review. *Food Science and Biotechnology* **16**: 675.

Nigmatova K, Morovsky M, Pristas P, Teather R, Holo H & Javorsky P (2007) Production of enterolysin A by rumen *Enterococcus faecalis* strain and occurrence of enlA homologues among ruminal Gram-positive cocci. *Journal of applied microbiology* **102**: 563-569.

Nilsen T, Nes IF & Holo H (2003) Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Applied and environmental microbiology* **69**: 2975-2984.

Odenyo AA, Mackie RI, Stahl DA & White BA (1994) The use of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to study competition between ruminal fibrolytic bacteria: development of probes for *Ruminococcus* species and evidence for bacteriocin production. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 3688-3696.

Paiva AD, Breukink E & Mantovani HC (2011) Role of lipid II and membrane thickness in the mechanism of action of the lantibiotic bovicin HC5. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **55**: 5284-5293.

Papadimitriou K, Anastasiou R, Mavrogonatou E, Blom J, Papandreu NC, Hamodrakas SJ, Ferreira S, Renault P, Supply P & Pot B (2014) Comparative genomics of the dairy isolate *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 against related members of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex. *BMC genomics* **15**: 272.

Pattnaik P, Kaushik J, Grover S & Batish V (2001) Purification and characterization of a bacteriocin-like compound (Lichenin) produced anaerobically by *Bacillus licheniformis* isolated from water buffalo. *Journal of applied microbiology* **91**: 636-645.

Perez RH, Zendo T & Sonomoto K (2014) Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbial cell factories* **13**: S3.

Rea MC, Ross RP, Cotter PD & Hill C (2011) Classification of bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Prokaryotic antimicrobial peptides*, p. 29-53. Springer.

Rychlik JL & Russell JB (2002) Bacteriocin-like activity of *Butyrivibrio fibrisolvens* JL5 and its effect on other ruminal bacteria and ammonia production. *Applied and environmental microbiology* **68**: 1040-1046.

Simmonds RS, Pearson L, Kennedy RC & Tagg JR (1996) Mode of action of a lysostaphin-like bacteriolytic agent produced by *Streptococcus zooepidemicus* 4881. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 4536-4541.

Singh M & Sareen D (2014) Novel LanT associated lantibiotic clusters identified by genome database mining. *PloS one* **9**: e91352.

Soliman W, Wang L, Bhattacharjee S & Kaur K (2011) Structure– activity relationships of an antimicrobial peptide plantaricin S from two-peptide class IIb bacteriocins. *Journal of medicinal chemistry* **54**: 2399-2408.

Sturt AS, Yang L, Sandhu K, Pei Z, Cassai N & Blaser MJ (2010) *Streptococcus gallolyticus* subspecies *pasteurianus* (biotype II/2), a newly reported cause of adult meningitis. *Journal of clinical microbiology* **48**: 2247-2249.

Teather R, Kalmokoff M, Whitford M, Bell C, Brylinsky M & Johnson-Green P (1999) The role of bacteriocins in rumen microbial ecology. p.^pp.

Toutain P-L, Ferran AA, Bousquet-Melou A, Pelligand L & Lees P (2016) Veterinary Medicine Needs New Green Antimicrobial Drugs. *Frontiers in Microbiology* **7**.

van der Meer JR, Rollema HS, Siezen RJ, Beerthuyzen MM, Kuipers OP & De Vos W (1994) Influence of amino acid substitutions in the nisin leader peptide on biosynthesis and secretion of nisin by *Lactococcus lactis*. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 3555-3562.

van Heel AJ, de Jong A, Montalban-Lopez M, Kok J & Kuipers OP (2013) BAGEL3: automated identification of genes encoding bacteriocins and (non-) bactericidal posttranslationally modified peptides. *Nucleic acids research* **41**: W448-W453.

Velásquez JE & Van der Donk WA (2011) Genome mining for ribosomally synthesized natural products. *Current opinion in chemical biology* **15**: 11-21.

Walsh CJ, Guinane CM, Hill C, Ross RP, O'Toole PW & Cotter PD (2015) In silico identification of bacteriocin gene clusters in the gastrointestinal tract, based on the Human Microbiome Project's reference genome database. *BMC microbiology* **15**: 183.

Wang G, Li X & Wang Z (2009) APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic acids research* **37**: D933-D937.

Wang G, Li X & Wang Z (2016) APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic acids research* **44**: D1087-D1093.

Waters AE, Contente-Cuomo T, Buchhagen J, Liu CM, Watson L, Pearce K, Foster JT, Bowers J, Driebe EM & Engelthaler DM (2011) Multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in US meat and poultry. *Clinical Infectious Diseases* **52**: 1227-1230.

Wells JE, Krause DO, Callaway TR & Russell JB (1997) A bacteriocin-mediated antagonism by ruminal lactobacilli against *Streptococcus bovis*. *FEMS microbiology ecology* **22**: 237-243.

Whitford M, McPherson M, Forster R & Teather R (2001) Identification of bacteriocin-like inhibitors from rumen *Streptococcus* spp. and isolation and characterization of bovicin 255. *Applied and environmental microbiology* **67**: 569-574.

Wilkinson B & Micklefield J (2007) Mining and engineering natural-product biosynthetic pathways. *Nature chemical biology* **3**: 379-386.

Willey JM & Van Der Donk WA (2007) Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annu Rev Microbiol* **61**: 477-501.

Xiao H, Chen X, Chen M, Tang S, Zhao X & Huan L (2004) Bovicin HJ50, a novel lantibiotic produced by *Streptococcus bovis* HJ50. *Microbiology* **150**: 103-108.

Xu J (2006) Invited review: microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. *Molecular ecology* **15**: 1713-1731.

Yamamoto M & Pop-Vicas AE (2014) Treatment for infections with carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: what options do we still have? *Critical Care* **18**: 229.

Zhao X & van der Donk WA (2016) Structural characterization and bioactivity analysis of the two-component lantibiotic Flv system from a ruminant bacterium. *Cell chemical biology* **23**: 246-256.

## CAPÍTULO 2

### ISOLAMENTO E SEQUENCIAMENTO DO GENOMA DE *STREPTOCOCCUS* ISOLADOS DE RÚMEN BOVINO E PREDIÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

#### 2.1 INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre a diversidade e complexidade do rúmen tem aumentado ao longo dos anos e diferentes microrganismos têm sido isolados e caracterizados. As bactérias representam o grupo mais abundante nesse ecossistema e estudos anteriores indicam que várias espécies podem produzir metabólitos de interesse biotecnológico, incluindo peptídeos antimicrobianos (Mantovani *et al.*, 2001, Paiva *et al.*, 2012, Letzel *et al.*, 2013, Creevey *et al.*, 2014). Alguns desses peptídeos são capazes de inibir espécies filogeneticamente relacionadas, enquanto outros apresentam amplo espectro de ação (Jenssen *et al.*, 2006, Hegarty *et al.*, 2016). Geralmente, os peptídeos antimicrobianos apresentam baixa toxicidade e atividade inibitória em concentrações nanomolares (Cui *et al.*, 2012, Wang *et al.*, 2014). As bacteriocinas produzidas pelas bactérias ruminais têm sido estudadas por apresentarem características desejáveis para a preservação de alimentos (Campion *et al.*, 2013, Furtado *et al.*, 2014), manipulação da fermentação ruminal (Wang *et al.*, 2014) e aplicação na terapia clínica como alternativa contra patógenos multirresistentes (Tiwari *et al.*, 2014).

Assim, os peptídeos antimicrobianos compreendem um grupo em potencial para o desenvolvimento de novos antimicrobianos e complementação de antibióticos convencionais utilizados no tratamento de infecções (Czyzewski *et al.*, 2016). Nos últimos anos, a resistência bacteriana a antibióticos tem sido uma questão global que levou a convergência de diversos grupos e áreas de estudo como a bioinformática, microbiologia e química (Grande Burgos *et al.*, 2014). De maneira geral, isso significa que a prospecção de microrganismos de interesse e o seu potencial metabólico podem agora ser avaliados usando uma abordagem multifacetária que incluem técnicas *in vitro*, *in silico* e *in vivo*.

O uso de ferramentas de bioinformática tem sido amplamente utilizado na identificação de genes envolvidos na síntese de metabólitos secundários, e vários

compostos tem sido identificados como resultado desses esforços (Letzel *et al.*, 2014). O rápido e contínuo crescimento em número e qualidade das ferramentas para análise de genomas bacterianos sequenciados e anotados tem criado novas oportunidades de compreender a diversidade metabólica bacteriana.

Esses estudos têm proporcionado análises da evolução de vias metabólicas específicas e suas propriedades, simulação das vias metabólicas e a biossíntese de compostos, bem como o fluxo metabólico baseado no contexto filogenético (Zhao & Kuipers, 2016). Dessa forma, a descoberta de *clusters* gênicos de biossíntese de compostos antimicrobianos pela mineração e comparação de genomas pode levar à identificação e subsequente isolamento de novas moléculas de interesse farmacológico e biotecnológico (Letzel *et al.*, 2014, Zhao & Kuipers, 2016).

Grande quantidade de informações para automatizar e otimizar o *screening* de clusters de bacteriocinas tem sido disponibilizado em diversos bancos de dados. Dentre esses, destaca-se o anti-SMASH (Medema *et al.*, 2011), Bagel (van Heel *et al.*, 2013) e BACTIBASE (Hammami *et al.*, 2010) que foram usados no presente estudo para identificar e prever *clusters* de peptídeos antimicrobianos em diferentes genomas bacterianos do rúmen (Letzel *et al.*, 2014).

O ecossistema ruminal, no entanto, tem grande potencial para isolamento de bactérias produtoras de peptídeos antimicrobianos eficazes no controle de patógenos humanos e animais. Neste trabalho, culturas de *Streptococcus* foram isoladas do rúmen de bovinos Nelore alimentados com forrageiras tropicais e o potencial para produção de compostos antimicrobianos contra diferentes patógenos bacterianos foi avaliado *in vitro*. Os genomas foram sequenciados e análises *in silico* foram efetuadas para a identificação de *clusters* de biossíntese de bacteriocinas e de outros peptídeos antimicrobianos.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios do Departamento de Microbiologia, no Setor de Bovinocultura de Corte (DZO-UFV) da Universidade Federal de Viçosa e no Instituto de Ciências Biológicas, Ambiental e Rural (IBERS) da Universidade de Aberystwyth (UK).

Todos os procedimentos de manipulação de animais e coleta de líquido ruminal foram conduzidos observando os preceitos éticos, de biossegurança e bem estar animal, conforme a legislação vigente e as recomendações da Comissão de Uso de Animais de Produção da Universidade Federal de Viçosa/ CEUAP (comissão de ética no uso de animais de produção em experimentação) da UFV, onde o projeto foi aprovado sob o número 061/2015.

### 2.2.1 Obtenção, cultivo e identificação dos microrganismos

O líquido ruminal foi coletado de três bovinos de corte canulados no rúmen e alimentados *ad libitum* com cana-de-açúcar contendo 4,0 % de proteína bruta com base na matéria seca. Durante o experimento, os animais receberam água e sal mineral à vontade e foram adaptados à dieta por 14 dias antes da coleta do líquido ruminal.

As amostras de líquido ruminal (1 L) foram coletadas de cada animal 3 a 4 horas após a alimentação matinal. A digesta ruminal foi filtrada através de quatro camadas de gaze imediatamente após a coleta, armazenada em frasco de vidro hermeticamente fechado, acondicionado em caixa de isopor e imediatamente transportado para o Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios do Departamento de Microbiologia da UFV. Os frascos foram incubados a 39 °C por 30 minutos para separação da fase líquida que foi utilizada no isolamento de bactérias ruminais e, posteriormente, na avaliação da atividade antimicrobiana contra patógenos bacterianos.

A fase líquida foi transferida anaerobicamente para frascos lacrados que foram utilizados para o isolamento das bactérias ruminais em câmara de anaerobiose. Para isso, 100 µL de cada amostra foram diluídos em 900 µL de solução de NaCl 0,85% até a diluição  $10^{-8}$  e alíquotas (100 µL) das diluições  $10^{-4}$  a  $10^{-8}$  foram plaqueadas em duplicata por *spread plate* em três meios anaeróbios: meio mínimo (MM), meio semissintético (SS) e meio complexo (MC). O MM sólido foi preparado com (por litro): 400 mg de glicose, 292 mg de  $K_2HPO_4$ , 292 mg de  $KH_2PO_4$ , 240 mg de  $(NH_4)_2SO_4$ ,

480 mg de NaCl, 100 mg de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 64 mg de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 400 mg de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 60 mg de cisteína HCl, 500 mg de extrato de levedura, 1500 mg de ágar, adicionado de vitaminas e minerais (Cotta & Russell, 1984). A composição do meio SS sólido foi (por litro): 292 mg de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 292 mg de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 480 mg de (NH<sub>4</sub>) SO<sub>4</sub>, 480 mg de NaCl, 100 mg de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 64 mg de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 500 mg de cisteína hidrocloreídica, 100 mg de Trypticase<sup>®</sup>, 50 mg de extrato de levedura, 400 mg de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e 1600 mg de glicose. A esse meio foi adicionado solução de ácidos orgânicos (1700 mg/L de ácido acético, 600 mg/L de ácido propiônico, 300 mg/L de ácido butírico, 100 mg/L de ácido valérico, 100 mg/L de ácido isovalérico, 100 mg/L de ácido isobutírico, 100 mg/L de ácido 2-metil-butírico) e 1500 mg de ágar (Cotta & Russell, 1984). O meio MC sólido continha (por 100 mL): 100 mg de Trypticase<sup>®</sup>, 25 mg de extrato de levedura, 20 mL de líquido ruminal (filtrado, centrifugado e autoclavado à 121° C por 15 min), 40 mg de carbonato de sódio, 20 mg de glicose, 20 mg de celobiose, 20 mg de maltose, 150 mg de ágar, adicionado de minerais (Hobson, 1969).

As placas foram incubadas em câmara de anaerobiose a 39 °C, por 24 ou 48 horas até a formação de colônias. As colônias isoladas que apresentaram características fenotípicas distintas foram coletadas com palito de dente estéril e transferidas para o mesmo meio de isolamento (MM, SS ou MC), sem a adição de ágar. Os isolados foram mantidos em placas de poliestireno de 96 poços e repicados em intervalos de 48 horas até a avaliação da atividade antimicrobiana.

### **2.2.2 Avaliação do espectro de ação**

O espectro de ação dos isolados cultivados nos três meios MM, SS e MC anaeróbios foram avaliados contra os microrganismos indicadores, *Enterococcus faecalis* ATCC 4083, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Listeria monocytogenes*, ATCC 7644, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* ATCC 355, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 4083, *Shigella flexneri* ATCC 12022 e *Citrobacter freundii* ATCC 8090. Além desses, foram usados os seguintes indicadores multiressistentes *E. faecalis* ATCC 19433, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13882, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *S. aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus equorum* (Amostra Clínica). Todos os indicadores

foram cultivados em meio BHI (Brain Heart Infusion Broth - Difco™) aerobicamente a 37 °C por 24 horas. Para os testes de atividade, as culturas dos indicadores foram incubadas previamente por 24 horas e diluídas para uma concentração final de 10<sup>5</sup> UFC/mL de acordo a escala de McFarland.

Foram realizados três ensaios distintos para avaliar a atividade antimicrobiana dos isolados: (i) inibição direta pela colônia dos isolados, (ii) difusão do sobrenadante das culturas em meio sólido e (iii) cultivo dos organismos indicadores no sobrenadante das culturas dos isolados a serem testados.

Nos testes de inibição direta (colônias), 1 µL de cada isolado cultivado a 37 °C por 24 horas foi inoculado na superfície dos meios SS, MM e MC (sólido). Em seguida, as placas de Petri foram incubadas anaerobicamente a 39 °C por 24 horas. Após o crescimento das colônias, as placas foram expostas ao vapor de clorofórmio (1,5 mL) por 30 minutos para inativação das células. Os microrganismos indicadores foram inoculados em meio semissólido (ágar 0,8%) e uma sobrecamada foi vertida sobre as placas de Petri contendo as colônias dos isolados. As placas foram incubadas a 4 °C *overnight* para difusão das possíveis substâncias antimicrobianas no meio sólido. Posteriormente, as placas foram incubadas à temperatura ótima de crescimento dos microrganismos indicadores e as zonas de inibição de crescimento foram mensuradas.

No teste de difusão em ágar, as culturas dos isolados foram cultivadas em meio MM, SS ou MC por 24 horas e então, centrifugadas (8000 x g por 10 minutos) para coleta do sobrenadante livre de células. Cada microrganismo indicador foi adicionado (*pour plate*) aos meios sólidos (ágar 1,5%) fundidos e a mistura foi vertida em placas de Petri estéreis. Poços de 5 mm de diâmetro no meio de cultura foram utilizados para adição do sobrenadante das células. Após incubação *overnight* a 4 °C, as placas foram incubadas à temperatura ideal de crescimento dos indicadores e os halos de inibição foram mensurados. A atividade dos isolados foi calculada a partir zona de inibição visível, considerando um raio mínimo de 3 mm, a partir da borda do orifício do poço ou da colônia.

O crescimento das culturas indicadoras no sobrenadante dos isolados de rúmen foi avaliado em placas de poliestireno de 96 poços. Em cada poço foi adicionado: 2 µL de solução de glicose 4 g/L e 20 µL da cultura do microrganismo indicador. Os tratamentos consistiram de 180 µL do sobrenadante de cada isolado tratado termicamente em banho-maria (80 °C/ 20 min) e novamente centrifugado (12 000 rpm/10 min). Três poços contendo 180 µL de meio líquido estéril (MM, SS e MC) e

outros três poços contendo 180 µL do sobrenadante de *Streptococcus equinus* JB1 (bactéria não bacteriocinogênica), foram usados como controles negativos. Como controle positivo, foram utilizados 180 µL de sobrenadante de *S. equinus* HC5 produtora de bovicina HC5. As placas foram incubadas à temperatura ótima de crescimento dos indicadores e as leituras de densidade óptica (D. O.) a 600 nm foram feitas em intervalos de 15 min ao longo de 24 horas.

### 2.2.3 Extração de DNA dos isolados com atividade antimicrobiana

Os isolados que apresentaram atividade antimicrobiana nos ensaios anteriores foram selecionados para a extração de DNA utilizando o Kit Wizard® Genomic Purification (Promega, Madison, USA), segundo especificações do fabricante. As amostras de DNA extraídas foram analisadas em gel de agarose (Sigma-Aldrich) 0,8 % em tampão TAE 1X [Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM e EDTA 1 mM (pH 8)], corados com brometo de etídio (0,25 µg mL<sup>-1</sup>) (Sambrook *et al.*, 1989). A quantificação foi realizada em espectrofotômetro a 600 nm. O DNA extraído foi visualizado no sistema de digitalização de imagens EagleEye™ (Stratagene, Cedar Creek, USA).

### 2.2.4 Amplificação do gene do RNA ribossomal 16S

O gene do rRNA 16S dos 13 isolados que apresentaram atividade antimicrobiana foi amplificado usando os *primers* universais 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGG-3') e 1492R (5'-ACGGGCGGTGTGTRC-3'). Foram utilizadas as seguintes condições para amplificação em termociclador Biocycler MG96G (São Paulo, Brasil): de 94 °C por 3 min, 94 °C por 1 min, 50 °C por 1 min, 72 °C por 1,4 min, 30 ciclos; 72 °C por 7 min, cada ciclo. As reações tinham aproximadamente: 10 ng de DNA genômico, 5 µL de tampão de reação GoTaq (5 X), 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (0,5 mmol L<sup>-1</sup>), 0,5 µL de dNTPs (2,5 mmol L<sup>-1</sup>), 1 µL de cada *primer* (10 mmol L<sup>-1</sup>), 0,2 µL Taq DNA polimerase (Promega Corporation, Madison, WI, USA) para uma reação de 25 µL totais. O produto das amplificações foi confirmado em gel de agarose 1,5 %. Os produtos de PCR foram sequenciados e as sequências do gene do rDNA 16S foram alinhadas e comparadas com outras sequências depositadas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

O alinhamento múltiplo das sequências do rDNA 16S dos isolados e de outros estreptococos foi feito utilizando SILVA rRNA database (Quast *et al.*, 2013), versão online (<https://www.arb-silva.de/>). Usando arquivo gerado em formato fasta foi realizada a construção da árvore filogenética usando o programa RAxML BlackBox (Stamatakis *et al.*, 2008) disponível em <http://embnet.vital-it.ch/raxml-bb/>, usando o método neighbor-joining (NJ) com *bootstrap* maior que 50%. Para visualização foi usado o software FigTree v1.4.3 (Drummond & Rambaut, 2007).

### **2.2.5 Sequenciamento e anotação dos genomas**

O DNA genômico dos cinco isolados foi preparado utilizando o kit Wizard Genomic DNA A1125 (Promega, Madison, WI, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. O DNA foi quantificado em triplicata com o ensaio Quantit dsDNA HS em um leitor de placas Eppendorf AF2200. As bibliotecas foram preparadas utilizando o Nextera XT Library Prep Kit (Illumina, San Diego, EUA) seguindo o protocolo do fabricante com as seguintes modificações: dois nanogramas de DNA com aumento no tempo de alongamento da PCR para 1 minuto. A quantificação do DNA e a preparação da biblioteca foram realizadas com o sistema automatizado da Hamilton Microlab® STAR™ Line.

As sequências foram determinadas utilizando a plataforma Illumina HiSeq 2000 (Illumina, Inc.) em MicrobesNG, Birmingham/United Kingdom. As *reads* foram ajustadas com o software Trimmomatic 0.30 usando *sliding window* Q15 (Bolger *et al.*, 2014). A montagem *de novo* foi realizada usando SPAdes versão 3.7 (Bankevich *et al.*, 2012), e os contigs foram anotados usando os servidores Prokka 1.11 (Seemann, 2014) e RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) disponível em <http://rast.nmpdr.org/rast.cgi> (Aziz *et al.*, 2008).

### **2.2.6 Análises *in silico* dos genomas de bactérias ruminais para prospecção de AMPs**

A identificação de *clusters* putativos de biossíntese de bacteriocinas e peptídeos antimicrobianos foi realizada utilizando os algoritmos BAGEL3 (van Heel *et al.*, 2013) e antiSMASH (Medema *et al.*, 2011) e os genomas completos das bactérias de interesse

no formato fasta (.fasta). O BACTIBASE (Hammami *et al.*, 2010) foi utilizado para identificar semelhanças entre os peptídeos precursores.

As sequências de proteínas hipotéticas, identificadas nos cinco genomas das bactérias ruminais foram analisadas individualmente utilizando os seguintes bancos de dados para predição de AMPs: “The Antimicrobial Peptide Database” (APD) (Wang & Wang, 2004); “Collection of Anti-Microbial Peptides” (CAMP) (Waghu *et al.*, 2014) e BACTIBASE (Hammami *et al.*, 2010). Para todos os bancos de dados foi considerado um *e-value* menor a  $1e^{-6}$  e um mínimo de 20% de identidade com a sequência de aminoácidos de outras proteínas conhecidas envolvidas na biossíntese de peptídeos antimicrobianos. As sequências consideradas como potenciais AMPs foram avaliadas quanto à presença de sequências de peptídeos antimicrobianos maduros com possível atividade biológica, usando os softwares CAMPr3 (Waghu *et al.*, 2014), função ‘Predict Antimicrobial region within Peptides’ e AMPA t-coffe, disponível em <http://tcoffee.crg.cat/apps/ampa/do> (Torrent *et al.*, 2012). As regiões gênicas associadas com AMPs putativos foram selecionados para síntese desses peptídeos e futuras análises *in vitro*.

Além dos bancos de dados de acesso livre, foi utilizado também o AMPLY, uma ferramenta protótipo atualmente em desenvolvimento no laboratório de Genômica Ecológica e Evolutiva da Aberystwyth University, no Reino Unido que visa identificar AMPs em dados genômicos e metagenômicos. Antes da análise, foram identificadas longas regiões abertas leitura no DNA (*longest open reading frames*, LORFs), usando o software TransDecoder (Haas & Papanicolaou, 2016). O limiar de qualidade foi descartado para incluir LORFs que apresentavam 20 aminoácidos ou mais. Estas sequências LORF foram então analisadas no AMPLY, usando correspondência de biossequências para de cerca de 15.000 sequências AMP de referência derivadas de uma série de bancos de dados, incluindo CAMPR3, APD2, AMPA e YADAMP. Todos os dados presentes no banco de dados AMPLY foram classificadas em uma série de categorias funcionais e sub-funcionais, que possibilitam o alinhamento de sequências de interesse com AMPs conhecidos usando DIAMOND. Os novos AMPs foram detectados usando modelos ocultos de Markov (HMMs), usando um modelo de *clusters* desenvolvido em IBM SPSS Statistics. Os HMMs foram baseados em uma versão modificada do conjunto AMPer (<https://omictools.com/amper-tool>) e apresentam 140 modelos de peptídeos maduros e 40 modelos para propeptídeos (Fjell *et al.*, 2007). O mecanismo de pontuação antimicrobiana foi baseado no algoritmo AMPA que segue

uma escala de potencial antimicrobiano derivada de resultados de triagem com bacteriocinas já conhecidas (Torrent *et al.*, 2012). O AMPLY utiliza o algoritmo AMPA reescrito em Python com características adicionais de pontuação e ranking, bem como uma extensão para detectar regiões antifúngicas.

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 Isolamento e caracterização

Ao todo, foram obtidos 463 isolados bacterianos sendo 159 oriundos do meio MM, 161 do meio SS e 143 do meio MC (Tabela S1). A atividade antimicrobiana dos isolados (n=463) foi analisada contra quatro indicadores bacterianos, utilizando a técnica de difusão em ágar (Mantovani & Russell, 2001), contra os seguintes indicadores: *Enterococcus faecalis* ATCC 4083, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* ATCC 355.

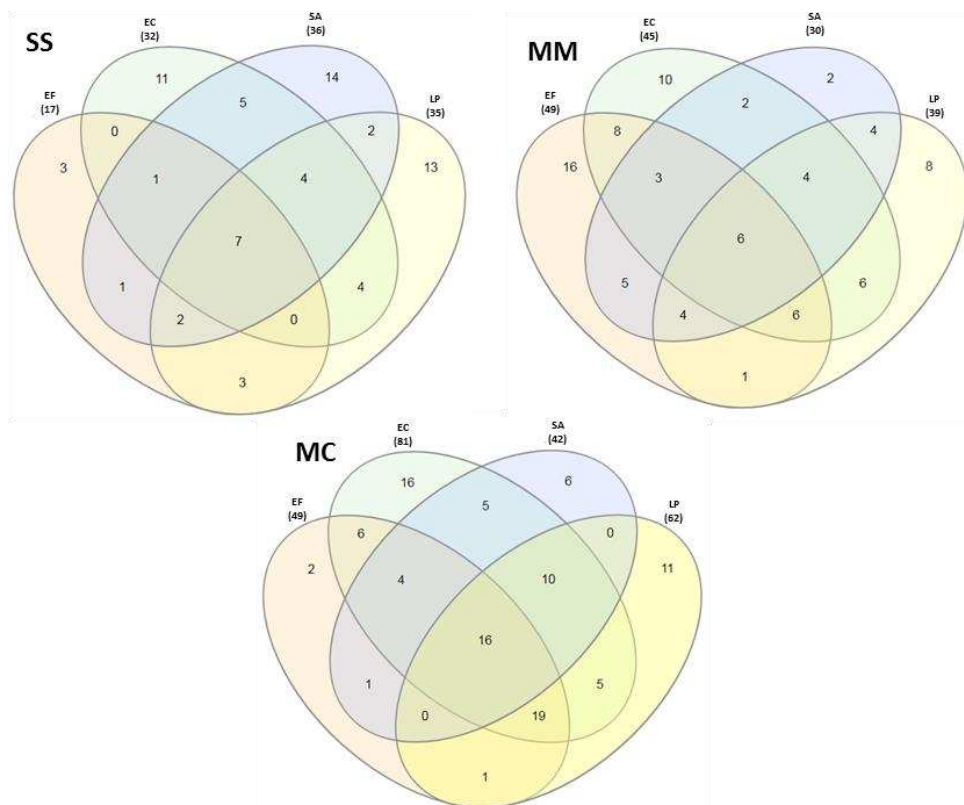
**Tabela 1:** Análise *in vitro* da atividade antibacteriana dos isolados avaliados neste estudo. Todas as bactérias indicadoras foram cultivadas em meio BHI a 37 °C e a presença de halos de inibição foi monitorada após incubação *overnight*.

Meio de cultura	<i>E. faecalis</i> ATCC 4083	<i>E. coli</i> ATCC 10536	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> ATCC 355
SS	17	32	36	35
MM	49	45	30	39
MC	49	81	42	62

(SS) meio semissintético; (MM) meio mínimo; (MC) meio complexo.

Setenta e seis isolados apresentaram atividade antimicrobiana contra pelo menos um dos indicadores testados em meio semissintético (SS). Desses, 17 apresentaram atividade contra *E. faecalis*, 32 contra *E. coli*, 36 contra *S. aureus* e 35 contra *L. paracasei*. Em meio mínimo (MM), 97 isolados apresentaram atividade antimicrobiana contra pelo menos um dos quatro indicadores, sendo que *E. faecalis* foi sensível a 49 isolados, *E. coli* à 45, *S. aureus* e *L. paracasei* foram sensíveis à 30 e 39 isolados, respectivamente. Em meio complexo (MC) 115 isolados apresentaram atividade

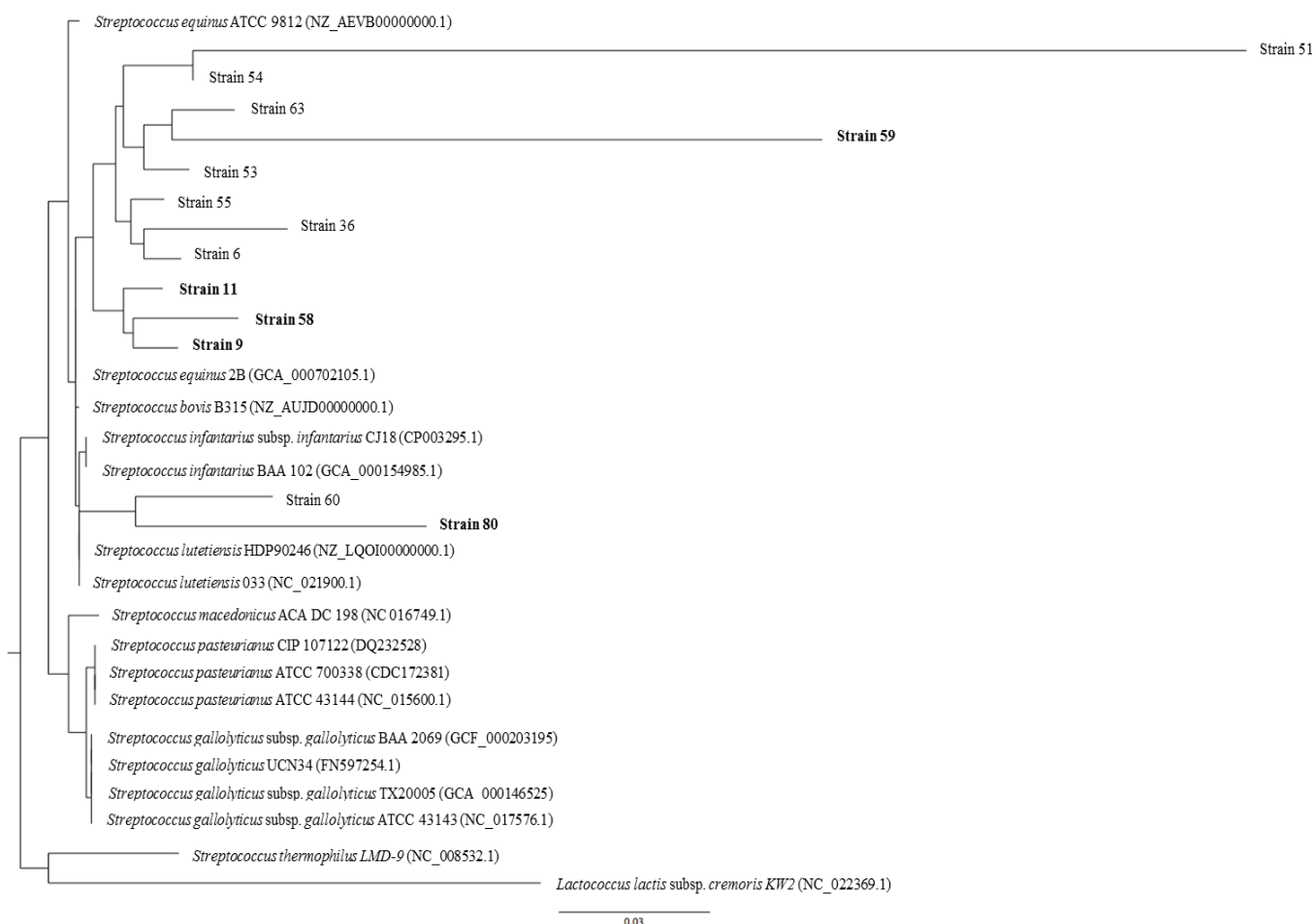
antimicrobiana no *screening in vitro*. Desses, 49 isolados foram ativos contra *E. faecalis*, 81 contra *E. coli*, 42 contra *S. aureus* e 62 contra *L. paracasei* (Figura 1).



**Figura 1.** Diagrama de Venn representado a atividade antibacteriana *in vitro* dos isolados avaliados neste estudo contra diferentes bactérias indicadoras. Todas as bactérias indicadoras foram cultivadas em meio BHI a 37 °C e a presença de halos de inibição foi monitorada após incubação *overnight*. Indicadores: *Enterococcus faecalis* ATCC 4083 (EF), *Escherichia coli* ATCC 10536 (EC), *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (AS) e *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* ATCC 355 (LP). Meios de cultura: semi sintético (SS), mínimo (MM) e complexo (MC).

Do total de isolados com atividade antimicrobiana, foram selecionados por apresentarem atividade contra pelo menos dois indicadores usados no *screening* inicial n=106. Desses foram selecionados 13 culturas com espectro de atividade contra indicadores Gram-negativos e Gram-positivos. As sequências do gene que codifica o rRNA 16S dos treze isolados selecionados que apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas foram comparadas com sequências disponíveis no banco de dados GenBank e Ribosomal Database Project (RDP). As porcentagens de identidade para os melhores scores no GenBank foram sempre superiores a 98% e os resultados obtidos no RDP em nível de espécie foram compatíveis ao GenBank (Tabela S6). A comparação das sequências de rDNA 16S indicaram que todos os isolados pertenciam ao gênero *Streptococcus*, concordando com

os resultados de caracterização fenotípica dos isolados. A espécie predominante foi *Streptococcus lutetiensis* (n= 12) (Figura 2). Cinco isolados (9, 11, 58, 59 e 80) que apresentaram diferentes espectros de ação foram selecionados e o DNA genômico foi extraído para sequenciamento dos genomas completos.



**Figura 2.** Relação filogenética de *S. lutetiensis* isolados do rúmen de bovinos (n=13). A árvore filogenética foi reconstruída usando o método neighbor-joining (NJ) com *bootstrap* maior que 5000 repetições com o programa RAxML BlackBox v7.7.1 e utilizando sequências de rDNA 16S de referência de diferentes espécies de *Streptococcus*. Os números de acesso GenBank das espécies são indicadas entre parênteses. A escala de barra representa três mudanças de nucleotídeos por 100 nucleotídeos analisados. Em negrito, estão destacados os isolados selecionados para sequenciamento do genoma completo.

### 2.3.2 Atividade antimicrobiana *in vitro*

Dos 106 isolados, oriundos do rúmen de novilhas Nelore, selecionados por apresentarem atividade contra pelo menos dois indicadores usados no *screening* inicial. Desses, todos foram caracterizados morfológicamente pela coloração diferencial de

Gram, variando entre Gram-positivos com forma ovoide ou bacilos, arranjados predominantemente como diplococcus ou estreptococos.

Todos os isolados selecionados (n=106) foram então submetidos a novos testes para avaliar a atividade antimicrobiana contra outros indicadores, além de confirmar os resultados anteriores. Foram testados contra seis bactérias patogênicas (*Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* ATCC 14028, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Enterococcus faecalis* ATCC 4083, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213), *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* ATCC 355 e a outras sete bactérias multirresistentes a antibióticos (*Shigella flexneri* ATCC 12022, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13882, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, isolado clínico de *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, e *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606), totalizando 14 indicadores com relevância clínica (Tabela 2).

**Tabela 2.** Caracterização morfológica e atividade antibacteriana *in vitro* dos isolados bacterianos obtidos do rúmen bovino. Foram listados apenas os isolados selecionados (n=106) que apresentaram atividade contra pelo menos dois dos 14 indicadores testados em três meios de cultivo diferentes (SS, MM, MC). Em negrito estão destacados os IDs dos 13 isolados que foram selecionados para caracterização posterior.

ID	Meio	Gram	Forma	Arranjo	<i>Salmonella enterica serovar Typhimurium</i> ATCC 14028	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 4083	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> ATCC 355	<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13882	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Staphylococcus equorum</i> (Amostra Clínica)
<b>1</b>	SS08	+	Cocos	ETC	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>2</b>	SS41	+	Cocos	ETC	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>3</b>	SS45	+	Cocos	ETC	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>4</b>	SS47	+	Cocos	ETC	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>5</b>	SS49	+	Cocos	DPC	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>6</b>	SS50	+	Cocos	ETC	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>7</b>	SS52	+	Cocos	ETC	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>8</b>	SS59	+	Bacilo	ETC	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>9</b>	SS65	+	Cocos	ETC	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>10</b>	SS71	+	Bacilo curto	ETC	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>11</b>	SS74	+	Cocos	ETC	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>12</b>	SS86	+	Bacilo curto	EFC	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>13</b>	SS89	+	Cocos	ETC	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>14</b>	SS90	+	Bacilo curto	ETC	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>15</b>	SS91	+	Bacilo curto	ETC	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>16</b>	SS93	+	Cocos	ETC	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>17</b>	SS94	+	Bacilo curto	ETC	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

**Continuação tabela 2.**

<b>18</b>	SS95	+	Bacilo curto	ETC	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>19</b>	SS97	+	Cocos	ETC	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>20</b>	SS98	+	Bacilo curto	ETC	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>21</b>	SS99	+	Bacilo curto	ETC	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>22</b>	SS101	+	Bacilo	ETC	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>23</b>	SS102	+	Bacilo curto	ETC	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>24</b>	SS103	+	Cocos	ETC	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>25</b>	SS125	+	Bacilo curto	ETC	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>26</b>	SS128	+	Cocos	EFC	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>27</b>	SS131	+	Cocos	EFC	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>28</b>	SS135	+	Bacilo	ETC	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>29</b>	SS147	+	Cocos	ETC	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>30</b>	SS148	+	Bacilo curto	ETC	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>31</b>	SS152	+	Cocos	ETC	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>32</b>	SS153	+	Bacilo curto	DPC	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>33</b>	SS154	+	Bacilo	ETC	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>34</b>	MM2	+	Cocos	ETC	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>35</b>	MM18	+	Cocos	ETC	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>36</b>	MM19	+	Cocos	ETC	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>37</b>	MM20	+	Cocos	ETC	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>38</b>	MM21	+	Cocos	ETC	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>39</b>	MM22	+	Bacilo	ETC	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>40</b>	MM27	+	Bacilo	ETC	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>41</b>	MM28	+	Bacilo	ETC	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>42</b>	MM29	+	Bacilo	ETC	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>43</b>	MM38	+	Cocos	ETC	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>44</b>	MM43	+	Bacilo	ETC	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-

**Continuação tabela 2.**

<b>45</b>	MM61	+	Cocos	ETC	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>46</b>	MM62	+	Cocos	ETC	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>47</b>	MM63	+	Bacilo	DPC	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>48</b>	MM66	+	Bacilo curto	ETC	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>49</b>	MM67	+	Cocos	ETC	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>50</b>	MM68	+	Cocos	ETC	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>51</b>	MM70	+	Cocos	ETC	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>52</b>	MM72	+	Cocos	ETC	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>53</b>	MM73	+	Cocos	ETC	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>54</b>	MM76	+	Cocos	ETC	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>55</b>	MM77	+	Cocos	ETC	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>56</b>	MM78	+	Cocos	ETC	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>57</b>	MM79	+	Cocos	ETC	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>58</b>	MM97	+	Cocos	ETC	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>59</b>	MM98	+	Cocos	ETC	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>60</b>	MM99	+	Cocos	ETC	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>61</b>	MM104	+	Cocos	ETC	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>62</b>	MM105	+	Cocos	ETC	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>63</b>	MM111	+	Cocos	ETC	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>64</b>	MM115	+	Cocos	ETC	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>65</b>	MM117	+	Cocos	ETC	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>66</b>	MM118	+	Bacilo	ETC	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>67</b>	MM119	+	Cocos	ETC	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>68</b>	MM136	+	Cocos	ETC	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>69</b>	MM145	+	Cocos	ETC	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>70</b>	MM147	+	Cocos	ETC	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>71</b>	MC1	+	Cocos	ETC	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-

---

72	MC2	+	Cocos	ETC	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
73	MC8	+	Cocos	ETC	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
74	MC9	+	Cocos	ETC	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
75	MC10	+	Cocos	ETC	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
76	MC14	+	Cocos	ETC	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
77	MC22	+	Cocos	ETC	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
78	MC23	+	Cocos	ETC	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
79	MC24	+	Cocos	ETC	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
80	MC39	+	Cocos	ETC	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
81	MC53	+	Cocos	ETC	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
82	MC80	+	Cocos	ETC	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
83	MC84	+	Cocos	ETC	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
84	MC88	+	Cocos	ETC	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
85	MC91	+	Cocos	ETC	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
86	MC96	+	Cocos	ETC	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
87	MC97	+	Cocos	ETC	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
88	MC98	+	Cocos	ETC	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
89	MC101	+	Cocos	ETC	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
90	MC103	+	Cocos	ETC	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
91	MC104	+	Cocos	ETC	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
92	MC106	+	Cocos	ETC	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
93	MC107	+	Cocos	ETC	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
94	MC108	+	Cocos	ETC	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
95	MC110	+	Bacilo	ETC	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
96	MC112	+	Cocos	ETC	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
97	MC114	+	Cocos	ETC	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

---

<b>98</b>	MC115	+	Cocos	ETC	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>99</b>	MC121	+	Cocos	ETC	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>100</b>	MC122	+	Cocos	ETC	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>101</b>	MC123	+	Cocos	ETC	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>102</b>	MC124	+	Cocos	ETC	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>103</b>	MC125	+	Cocos	ETC	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>104</b>	MC127	+	Cocos	ETC	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>105</b>	MC130	+	Cocos	ETC	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>106</b>	MC131	+	Cocos	ETC	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

(-) ausência de zona de inibição; (+) presença de zona inibição; (SS) meio semissintético; (MM) meio mínimo; (MC) meio complexo; (ETC) estreptococos; (DPC) diplococos; (EFC) estafilococos.

Dos isolados com atividade antimicrobiana (n=106), foram selecionados 13 culturas com espectro de atividade contra indicadores Gram-negativos e Gram-positivos. Com esses isolados (n=13) foram realizados testes com outras três bactérias multirresistentes, *E. faecalis* ATCC 19433, *E. coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. A atividade de inibição apresentada pelos isolados avaliados neste trabalho foi calculada a partir da zona de inibição visível descontando o diâmetro da colônia, sendo expressa em milímetros. Os cinco isolados de *Streptococcus* avaliados neste trabalho apresentaram atividade antimicrobiana apenas contra os indicadores patogênicos, não sendo ativos contra nenhuma das bactérias multirresistentes (Tabela 3).

**Tabela 3.** Características e padrão de inibição *in vitro* dos 13 isolados selecionados contra os indicadores patogênicos e multirresistentes. Em destaque, os cinco isolados selecionados para sequenciamento completo do genoma.

ID	Meio/Isolado	Indicadores															
		<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium ATCC 14028	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 4083	<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13882	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Staphylococcus equorum</i> (Amostra Clínica)
6	SS50	++	-	++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>9</b>	SS65	+	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>11</b>	SS74	+++	+	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	MM19	+++	-	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51	MM70	+++	++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53	MM73	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54	MM76	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55	MM77	-	-	++	+++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>58</b>	MM97	+++	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>59</b>	MM98	-	-	++	+++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	MM99	-	-	++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63	MM111	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>80</b>	MC39	-	++	++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) ausência de zona de inibição; (+) para halos de inibição de 1 a 8 mm; (++) para halos de inibição de 9 a 14 mm; (+++) para halos de inibição de 15 a 23 mm.

### 2.3.3 Dados do genoma parcial de *Streptococcus*

Os genomas variam em tamanho de 1,85 Mbp a 1,98 Mbp. O conteúdo G+C de todos os isolados variou entre 37,4 e 38,02%. As sequências de nucleotídeos foram montadas em *contigs*, que variaram entre 16 e 33, dependendo do genoma analisado. O número de sequências codificadoras (CDs) foi anotado, cobrindo aproximadamente 96,95 +/- 2,3% de cada cromossomo. As CDs foram distribuídas em 27 categorias de subsistemas pelo RAST. Todos os isolados apresentam entre 52 a 55 genes de tRNA (Tabela 4).

**Tabela 4.** Principais características dos genomas parciais de bactérias ruminais sequenciados nesse estudo.

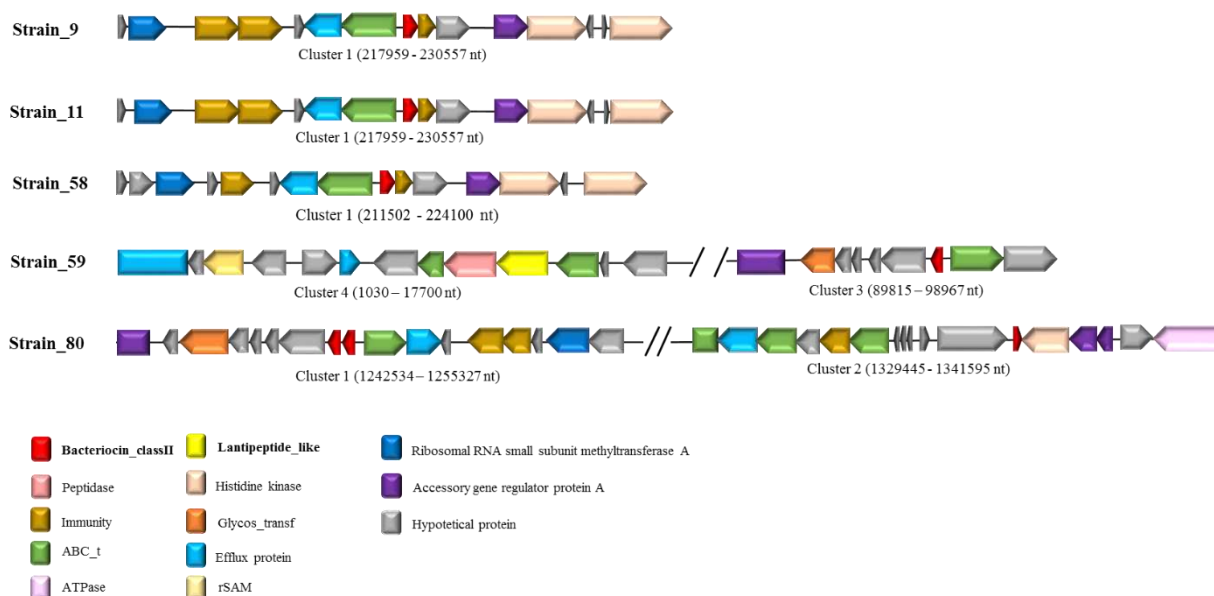
Strain	Species (RNA 16S)	Size (bp)	No. of reads	Contigs	G+C (%)	CDs	No. of tRNAs	N50	N75
9	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	1.849.765	261881	21	37,95	1750	54	1451917	1451917
11	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	1.854.024	170826	33	37,96	1751	54	1214823	234716
58	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	1.854.488	219215	16	38,02	1791	55	1463551	1463551
59	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	1.977.774	158064	28	37,4	1871	52	1460340	98967
80	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	1.902.765	166894	18	37,85	1813	54	248939	1460340

### 2.3.4 Prospecção de peptídeos antimicrobianos

Os cinco genomas completos de *S. lutetiensis* (isolado 9, 11, 58, 59 e 80) foram analisados em dois algoritmos para mineração de genes de biossíntese de bacteriocinas (antiSMASH e BAGEL3). Em todos os genomas analisados foram encontrados pelo menos um *cluster* putativo que pode estar relacionado à biossíntese de bacteriocinas. Nos genomas de *S. lutetiensis* (isolados 9, 11, 58 e 80), *cluster* 1 e no genoma de *S. lutetiensis* 59 (*cluster* 3) foram encontrados *clusters* gênicos putativos associados com a biossíntese de bacteriocinas da classe II. O genoma do isolado 59 também apresentou um segundo *cluster* gênico (*cluster* 4) relacionado com a biossíntese de lantibióticos (Figura 3).

Nos *clusters* associados com a biossíntese de bacteriocina da classe II, foram encontrados um domínio (família TIGR01193) codificando proteínas do tipo transportador ABC (ABC-type bacteriocin transporter) e proteínas acessórias (LagD) relacionadas ao efluxo e processamento de proteínas. O peptídeo relacionado a bacteriocina (PF04362.9) dos isolados (*S. lutetiensis* 9, 11 e 58) mostrou conservação com precursor da ubericina A (*ubaA*), a primeira bacteriocina class IIa caracterizada produzida pelo gênero *Streptococcus* (*Streptococcus uberis*) (Heng et al. 2007). As análises indicaram que as bacteriocinas da classe II desses isolados podem ser reguladas pelo sistema de dois componentes, histidina cinase e reguladores de resposta que estão adjacentes aos peptídeos potencialmente envolvidos na produção de bacteriocinas. Além disso, regiões relacionadas a regulação e auto imunidade (CAAX protease self-immunity) da família Abi (pfam02517), foram identificadas. O isolado *S. lutetiensis* 80, apresentou dois *clusters* putativos para presença de bacteriocinas da classe II, assim como o isolado de *S. lutetiensis* 59 (*cluster* 3), com sitio de glicina dupla no péptido líder e homologia a bacteriocina classe IIc.

O isolado *S. lutetiensis* 59, apresentou um segundo *cluster* (*cluster* 4) putativo para produção de lantibiótico, pela presença da enzima de modificação LanC (LanC\_like). Proteínas do tipo transportador ABC (ABC-type bacteriocin transporter) e rSAM foram encontrados adjacentes ao peptídeo precursor. As proteínas rSAM, membros da família TIGR04545, são conhecidas por ocorrerem em cassetes juntamente com a sequência de sinal da bacteriocina e por estarem envolvidas na maturação do peptídeo (Haft & Basu, 2011). O *cluster* também apresentou o domínio da peptidase C39, proteína envolvida a com o transporte de haloduracina (Singh & Sareen, 2014).



**Figura 3.** Diagrama representativo da organização dos clusters de bacteriocinas encontrados nos cinco isolados ruminantes provenientes desse estudo. Genes que codificam peptídeos preditos com função similar estão representados pelas cores: transportador ABC (verde), proteínas acessórias de transporte/efluxo (azul claro), regulador de resposta (roxo), bacteriocina classe II (vermelho), lantibiótico (amarelo), glicosil transferase (laranja), imunidade (marrom), rSAM (amarelo claro), histidina quinase (laranja), peptidase (rosa), proteínas hipotéticas (cinza). Validação dos clusters pelo BLAST (Tabela S7).

A presença de genes potencialmente associados com a biossíntese de peptídeos antimicrobianos (AMPs) inicialmente foi analisada com base no arquivo de genes únicos de cada um dos cinco isolados. No *S. lutetiensis* 9, não foram encontrados genes únicos, todos os genes foram compartilhados com os demais isolados. *S. lutetiensis* 11 apenas quatro genes únicos foram encontrados e apenas um gene foi identificado como proteína hipotética. *S. lutetiensis* 58 e *S. lutetiensis* 80 apresentaram 102 e 198 genes únicos, respectivamente. O *S. lutetiensis* 59, com maior divergência quando comparado aos demais, apresentou 234 genes únicos, de acordo com o arquivo de genes ortólogos gerado pelo progressiveMAUVE. Os demais genes foram compartilhados entre dois ou mais isolados, comprovando a proximidade entre as espécies.

As sequências de genes únicos de cada isolado foram anotadas manualmente, e os genes designados como proteínas hipotéticas foram analisados nos bancos de dados de livre acesso Blastnt, CAMPr3 e APD para prospecção de peptídeos antimicrobianos. Dos 102 genes únicos do isolado 58 de *S. lutetiensis*, 65 genes foram considerados proteínas hipotéticas, com base nas análises dos bancos de dados. Desses, 34 genes podem estar relacionados com a codificação de possíveis peptídeos

antimicrobianos. *S. lutetiensis* 80 apresentou 91 hipotéticas proteínas dentre os genes únicos e desses 45 genes podem ser considerados possíveis peptídeos antimicrobianos. No isolado 59 (*S. lutetiensis*) de 110 genes únicos 76 genes podem estar envolvidos na codificação de peptídeos antimicrobianos.

Posteriormente, foi feita a investigação para biossíntese de AMPs com base no arquivo de genes ortólogos (n=9010) gerado pelo software progressiveMAUVE, comparando com o padrão de atividade antimicrobiana (Tabela 3) apresentado pelos cinco isolados selecionados nos testes *in vitro*. Considerando que as cinco espécies apresentaram atividade antimicrobiana contra *Salmonella enterica* Typhimurium ATCC 14028 e *Escherichia coli* ATCC 10536, a análise foi feita buscando justificar a atividade inibitória contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, analisando os genes presentes nos *S. lutetiensis* (isolados 9, 11 e 58) e ausentes em *S. lutetiensis* (isolado 59 e 80). Além disso, foram avaliados possíveis diferenças que justificassem as diferenças de atividade contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, analisando os genes ausentes em *S. lutetiensis* (isolado 58 e 59), mas presentes nos demais isolados.

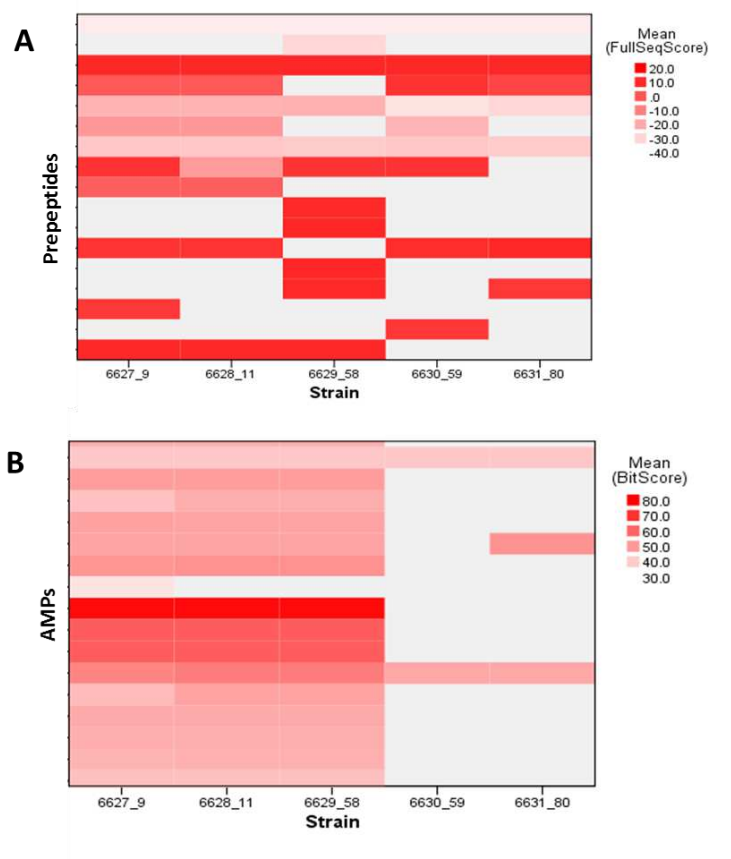
Foram encontrados 47 genes ausentes nos isolados *S. lutetiensis* 59 e 80, mas presente nos demais isolados, dentre esses 17 proteínas hipotéticas, que foram investigadas usando Blastp, CAMPr3 e APD para a prospecção de possíveis AMPs. Por outro lado, apenas um gene esteve ausente *S. lutetiensis* 58 e 59, sendo este associado com a biossíntese de AMP de acordo com os bancos de dados usados nas análises. Com base nisso, as 18 sequências selecionadas foram submetidas a novas análises para seleção de sequências específicas com possível atividade usando CAMPr3 e AMPA\_t-coffee. Nove sequências de peptídeos foram anotadas e os peptídeos foram sintetizados para posteriores análises *in vitro* (Tabela 5).

**Tabela 5.** Sequências de peptídeos preditos com possível atividade antimicrobiana.

s/n	Peptide ID	Peptide Sequence	Nº of aa	Strain*
1	imf3	SVTNRFIKPCFL	14	9, 11 and 58
2	imf3_acetyl	SVTNRFIKPCFL	14	9, 11 and 58
3	imf4	LWKKTKKFQTFQ	12	9, 11 and 58
4	imf4_B	HFILCYRYKGYVPG	14	9, 11 and 58
5	imf6	KVPVKIVWFNQTRTLRFFTLFL	22	9, 11 and 58
6	imf15	NHITYRKLRS GG	12	9, 11 and 58
7	imf17	EKCGKLFPRRFVCPH	16	9, 11 and 58
8	imf17_B	GKKVKAVVRKQARSGN	16	9, 11 and 58
9	imf18	WYWLAYIVVTFI	12	9, 11 and 80

\*Isolados que apresentam as sequências com os peptídeos preditos.

Usando o banco de dados em desenvolvimento na Universidade Aberystwyth, AMPLY, foi realizada uma análise comparativa com o genoma completo dos cinco isolados quanto a presença de regiões correspondentes a possíveis AMPs. Nesta análise, foi investigada quanto a presença de todas as classes de peptídeos antimicrobianos maduros, incluindo prepeptídeos. Os perfis de comparação de potenciais sequências antimicrobianas foram superiores nos isolados *S. lutetiensis* 9, *S. lutetiensis* 11 e *S. lutetiensis* 58 quando comparado aos outros dois isolados (*S. lutetiensis* 59 e 80), mas significativamente não relevante (Figura 4B). Já para as sequências homólogas de prepeptídeos o *S. lutetiensis* 58 apresentou a maior diversidade de bandas com similaridade às sequências presentes no banco de dados Amply, seguido dos isolados de *S. lutetienses* 9 e 59, com um padrão de sequências superior quando comparadas aos peptídeos maduros (Figura 4A).



**Figura 4.** Perfil de comparação dos isolados ruminiais quanto à prospecção de sequências putativas de peptídeos antimicrobianos (AMPs). O perfil foi gerado usando informações disponíveis no banco de dados AMPLY. (A) Identificação de AMPs maduros em todo o genoma dos cinco isolados sequenciados neste trabalho. (B) Identificação de pré-peptídeos, sequências não modificadas e/ou clivadas presentes nos genomas completos dos cinco isolados sequenciados neste trabalho.

## 2.4 DISCUSSÃO

Estudos sobre a biologia básica dos AMPs mostram que essas moléculas possuem várias funções na defesa do hospedeiro, inflamação, regeneração tecidual e podem estar envolvidas na patogênese de várias doenças, sendo indicadas como candidatas no desenvolvimento de novos medicamentos (Koczulla & Bals, 2003). A ocorrência de atividade antimicrobiana entre diferentes espécies de bactérias do ecossistema ruminal tem sido demonstrada associando métodos de *screening in vitro* (Russell & Mantovani, 2002) e *in silico* (Azevedo *et al.*, 2015) para prospecção de novos peptídeos. Nesse contexto, foram obtidos cento e seis isolados de amostras de líquido ruminal, coletadas de bovinos Nelore alimentados com forrageiras tropicais. A seleção ocorreu em um *screening inicial* com base na produção de atividade inibitória contra três bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas (*Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) e um *Lactobacillus paracasei*, espécie que demonstrou sensibilidade a antimicrobianos em estudos anteriores (Georgieva *et al.*, 2015). Durante as análises *in vitro* os isolados se revelaram pouco fastidiosos e de crescimento rápido.

Treze bactérias foram selecionadas e a produção de atividade inibitória foi testada contra 16 indicadores patogênicos e multirresistentes. A falta de atividade contra as bactérias indicadoras multirresistentes pode ser justificada pelo contato previo dessas bactérias a diferentes antibióticos o que pode ter levado a resistência contra os mecanismos de ação de antimicrobianos produzidos pelos isolados desse trabalho. A resistência pode ser um fenômeno ecológico que ocorre como resposta da bactéria frente ao amplo uso de antibióticos e sua presença no meio ambiente. As bactérias multiplicam-se rapidamente, sofrem mutação e podem trocar material genético entre linhagens de mesma espécie ou de espécies diferentes (Harbarth *et al.*, 2015). São consideradas microrganismos de alta capacidade de adaptação a diversos fatores, como a exposição a agentes químicos potentes. O conhecimento dos mecanismos bioquímicos e genéticos envolvidos na resistência bacteriana é de grande importância para se entender como a bactéria pode desenvolver a resistência (Dibner & Richards, 2005). Bem como a identificação de moléculas, com características específicas, que podem ser usadas como alternativas ao uso indiscriminado dos antibióticos convencionais.

Letzel e colaboradores (2014) reportaram que em 211 genomas de bactérias anaeróbias mais de 25% das sequências investigadas codifica pelo menos uma ou mais

classes de peptídeos sintetizados ribossomicamente e modificados pós-traducionalmente (Letzel *et al.*, 2014). Nos resultados obtidos nesse estudo, dos cinco isolados senqueciados foram encontrados pelo menos um cluster de bacteriocina em cada um dos isolados. Nas análises do sequenciamento dos genes RNA 16S, os treze isolados foram classificados como *Streptococcus lutetiensis* (Figura 3), concordando com características fenotípicas (coloração de Gram) identificadas previamente. Como *Streptococcus* é um gênero de grande representatividade no ecossistema ruminal, bem como na produção de bacteriocinas (Mantovani & Russell, 2001, Whitford *et al.*, 2001, Jans *et al.*, 2015), comparando com os resultados do *screening* contra as bactérias patogênicas, cinco genomas foram sequenciados e investigados quanto à produção de AMPs. Nesse estudo, foram identificados sete *clusters* gênicos putativos (Figura 3) de biossíntese de bacteriocinas nos cinco genomas analisados, o que pode justificar a atividade antimicrobiana apresentada previamente nos teste de difusão em ágar (Tabela 4). Um *cluster* foi associado com a biossíntese de bacteriocinas da classe I e seis a biossíntese de bacteriocinas da classe II.

As bacteriocinas da classe II, identificadas em bactérias ruminais são comumente encontradas no filo Firmicutes, em especial nas ordens Lactobacillales and Clostridiales (Kjos *et al.*, 2011). Nas análises realizadas com o genoma do isolados *S. lutetienses* (isolados 9, 11 e 58) foram encontradas três *clusters* envolvidos na síntese de bacteriocinas classe IIa. Nos testes realizados *in vitro*, esses isolados apresentaram atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. Em estudos anteriores foi reportado que essa classe de bacteriocina é particularmente ativa contra espécies *Listeria*, podendo inibir outros grupos como *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Clostridium* (Eijsink *et al.*, 1998). A classe IIa de bacteriocinas apresentam algumas características específicas, como a sequência consenso N-terminal (YGNGVXaaC), presente em diferentes bacteriocinas dessa classe, a exemplo de pediocina PA-1, enterocina A e bacteriocina 31 (Eijsink *et al.*, 1998). No entanto, outras bacteriocinas da classe IIa, curvacina A, enterocina P e ubericina A, fazem parte de um grupo que possuem sequência N-terminal alterada (YGNG(L)YCNxxKCWVNxxE). Essa alteração é devido a ausência de resíduos de triptofano e/ou de cisteína estabilizadores perto ou na extremidade C-terminal que é presente na maioria das bacteriocinas de classe IIa (Cui *et al.*, 2012) (Ennahar *et al.*, 2000). Os *S. lutetienses* (isolados 9, 11 e 58) compartilham uma sequência consenso incompleta assim como algumas das bacteriocinas dessa classe.

Por sua vez, os *clusters* de biossíntese dos isolados *S. lutetienses* 59 e 80 mostraram homologia com a superfamília (pfam10439) de bacteriocinas classe IIc. Bacteriocinas que possuem a extremidade N-terminal covalentemente ligada à extremidade C-terminal, formam anéis em sua estrutura e apresentam amplo espectro, alta estabilidade ao pH e temperatura, bem como resistência a enzimas proteolíticas (Rea *et al.*, 2011, Gabrielsen *et al.*, 2014). Normalmente a classe IIc apresenta peptídeo líder com dupla glicina (Lux *et al.*, 2007). Nos *clusters* dos isolados desse trabalho, os isolados *S. lutetienses* 59 e 80, também foi observada a presença do peptídeo líder com dupla glicina. Em todos os *clusters* foram identificados complexos de transportadores do tipo ABC acompanhado de proteínas relacionadas ao efluxo de proteínas (P620\_00345), bem como genes relacionado com a imunidade aos peptídeos.

Apenas um *cluster*, do isolado *S. lutetiensis* 59 foi relacionado com a biossíntese de bacteriocina da classe I, com uma região homologa a enzima de modificação LanC (LanC-like), envolvida com a regulação e biossíntese de lantibióticos (Figura 3). A classe I é formada por peptídeos que são estáveis ao calor e sofrem modificação pós-traducional, com formação de anéis de lantionina característicos do grupo (Guder *et al.*, 2000, Deegan *et al.*, 2006). Esses peptídeos são subdivididos em classe I e II, em função das enzimas responsáveis por suas modificações pós-traducionais. Os peptídeos que pertencem à classe I são aqueles modificados por enzimas denominadas LanB e LanC e os lantibióticos classe II são modificadas pela enzima LanM (Willey & Van Der Donk, 2007, Begley *et al.*, 2009). De acordo com Hyink *et al.* (2005) e Wirawan *et al.* (2006), a presença de qualquer um desses genes de modificação é suficiente para considerar um isolado bacteriano como potencialmente produtor de lantibióticos (Hyink *et al.*, 2005, Wirawan *et al.*, 2006). Além disso, foram identificadas genes do tipo ABC e rSAM adjacentes ao precursor dos peptídeos, que podem estar envolvidas na maturação do peptídeo. Sactipeptídeos, bactericinas também da classe I, apresentam em sua estrutura ligações intramoleculares (enxofre, cisteína e um carbono alfa de outro resíduo de aminoácido), que resultam de modificações pós-traducionais catalisadas por enzimas rSAM (Haft & Basu, 2011).

Nas análises realizadas com Amply, foram observados diferenças no padrão de sequências homólogas aos peptídeos maduros, em relação aos prepeptídeos disponíveis nesse banco de dados (Figura 3). Em estudo anterior, algumas características já foram identificadas nos domínios propeptídicos, como os conteúdos de aminoácidos não polares, aminoácidos polares, aminoácidos ácidos e básicos e as suas respectivas cargas

líquidas. As bacteriocinas maduras diferem entre si pela massa molecular, ponto isoelétrico, presença de grupos particulares de aminoácidos, número de resíduos de aminoácidos com grupos de cadeia lateral ionizáveis, carga positiva líquida e ausência de aminoácidos conservados nas sequências (Jack *et al.*, 1995). Essas observações indicam que esses fatores podem interferir na modificação postraducional e na maturação desses peptídeos, podendo justificar a diferença no padrão de sequências homólogas ao peptídeos maduros (Figura 3B).

## 2.5 CONCLUSÕES

*Streptococcus* foi o gênero de bactéria ruminal com atividade antimicrobiana mais frequentemente isolado do rúmen bovino.

*S. lutetiensis* 9 e *S. lutetis* 11 foram os isolados que apresentaram maior espectro de ação contra bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas.

Os cinco genomas de *Streptococcus* sequenciados apresentaram potencial para produção de peptídeos antimicrobianos.

*S. lutetiensis* 59 e 80 apresentaram dois *clusters* gênicos putativos de biossíntese de bacteriocinas. Os demais isolados apresentaram apenas um cluster gênico putativo para bacteriocinas.

## 2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Azevedo AC, Bento CB, Ruiz JC, Queiroz MV & Mantovani HC (2015) Distribution and genetic diversity of bacteriocin gene clusters in rumen microbial genomes. *Applied and environmental microbiology* **81**: 7290-7304.

Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM & Kubal M (2008) The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC genomics* **9**: 75.

Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S & Prjibelski AD (2012) SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology* **19**: 455-477.

Begley M, Cotter PD, Hill C & Ross RP (2009) Identification of a novel two-peptide lantibiotic, lichenicidin, following rational genome mining for LanM proteins. *Applied and environmental microbiology* **75**: 5451-5460.

Bolger AM, Lohse M & Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **btu170**.

Campion A, Casey PG, Field D, Cotter PD, Hill C & Ross RP (2013) In vivo activity of Nisin A and Nisin V against *Listeria monocytogenes* in mice. *BMC microbiology* **13**: 23.

Cotta MA & Russell JB (1984) Effect of Peptides and Amino Acids on Efficiency of Rumen Bacterial Protein Synthesis in Continuous Culture. *Journal of Dairy Science* **65**: 226-234.

Creevey CJ, Kelly WJ, Henderson G & Leahy SC (2014) Determining the culturability of the rumen bacterial microbiome. *Microbial biotechnology* **7**: 467-479.

Cui Y, Zhang C, Wang Y, Shi J, Zhang L, Ding Z, Qu X & Cui H (2012) Class IIa bacteriocins: diversity and new developments. *International journal of molecular sciences* **13**: 16668-16707.

Czyzewski AM, Jenssen H, Fjell CD, Waldbrook M, Chongsiriwatana NP, Yuen E, Hancock RE & Barron AE (2016) In Vivo, In Vitro, and In Silico Characterization of Peptoids as Antimicrobial Agents. *PloS one* **11**: e0135961.

Deegan LH, Cotter PD, Hill C & Ross P (2006) Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International dairy journal* **16**: 1058-1071.

Dibner J & Richards J (2005) Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poultry science* **84**: 634-643.

Drummond AJ & Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC evolutionary biology* **7**: 214.

Eijsink VG, Skeie M, Middelhoven PH, Brurberg MB & Nes IF (1998) Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 3275-3281.

Ennahar S, Sashihara T, Sonomoto K & Ishizaki A (2000) Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS microbiology reviews* **24**: 85-106.

Fjell CD, Hancock RE & Cherkasov A (2007) AMPer: a database and an automated discovery tool for antimicrobial peptides. *Bioinformatics* **23**: 1148-1155.

Furtado DN, Todorov SD, Landgraf M, Destro MT & Franco BD (2014) Bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DF04Mi isolated from goat milk: characterization of the bacteriocin. *Brazilian Journal of Microbiology* **45**: 1541-1550.

Gabrielsen C, Brede DA, Nes IF & Diep DB (2014) Circular bacteriocins: biosynthesis and mode of action. *Applied and environmental microbiology* **80**: 6854-6862.

Georgieva R, Yocheva L, Tserovska L, Zhelezova G, Stefanova N, Atanasova A, Danguleva A, Ivanova G, Karapetkov N & Rumyan N (2015) Antimicrobial activity and antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. intended for use as starter and probiotic cultures. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **29**: 84-91.

Grande Burgos MJ, Pulido RP, del Carmen López Aguayo M, Gálvez A & Lucas R (2014) The cyclic antibacterial peptide enterocin AS-48: isolation, mode of action, and possible food applications. *International journal of molecular sciences* **15**: 22706-22727.

Guder A, Wiedemann I & Sahl HG (2000) Posttranslationally modified bacteriocins—the lantibiotics. *Peptide Science* **55**: 62-73.

Haas B & Papanicolaou A (2016) TransDecoder (find coding regions within transcripts). p.^pp.

Haft DH & Basu MK (2011) Biological systems discovery in silico: radical S-adenosylmethionine protein families and their target peptides for posttranslational modification. *Journal of bacteriology* **193**: 2745-2755.

Hammami R, Zouhir A, Le Lay C, Hamida JB & Fliss I (2010) BACTIBASE second release: a database and tool platform for bacteriocin characterization. *Bmc Microbiology* **10**: 22.

Harbarth S, Balkhy HH, Goossens H, Jarlier V, Kluytmans J, Laxminarayan R, Saam M, Van Belkum A & Pittet D (2015) Antimicrobial resistance: one world, one fight! *Antimicrobial Resistance and Infection Control* **4**: 49.

Hegarty JW, Guinane CM, Ross RP, Hill C & Cotter PD (2016) Bacteriocin production: a relatively unharnessed probiotic trait? *F1000Research* **5**.

- Hyink O, Balakrishnan M & Tagg JR (2005) Streptococcus rattus strain BHT produces both a class I two-component lantibiotic and a class II bacteriocin. *FEMS microbiology letters* **252**: 235-241.
- Jack RW, Tagg JR & Ray B (1995) Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological reviews* **59**: 171-200.
- Jans C, Meile L, Lacroix C & Stevens MJ (2015) Genomics, evolution, and molecular epidemiology of the Streptococcus bovis/Streptococcus equinus complex (SBSEC). *Infection, Genetics and Evolution* **33**: 419-436.
- Jenssen H, Hamill P & Hancock RE (2006) Peptide antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews* **19**: 491-511.
- Kjos M, Borrero J, Opsata M, Birri DJ, Holo H, Cintas LM, Snipen L, Hernandez PE, Nes IF & Diep DB (2011) Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Microbiology* **157**: 3256-3267.
- Koczulla AR & Bals R (2003) Antimicrobial peptides. *Drugs* **63**: 389-406.
- Letzel A-C, Pidot SJ & Hertweck C (2013) A genomic approach to the cryptic secondary metabolome of the anaerobic world. *Natural product reports* **30**: 392-428.
- Letzel A-C, Pidot SJ & Hertweck C (2014) Genome mining for ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs) in anaerobic bacteria. *BMC genomics* **15**: 983.
- Lux T, Nuhn M, Hakenbeck R & Reichmann P (2007) Diversity of bacteriocins and activity spectrum in Streptococcus pneumoniae. *Journal of bacteriology* **189**: 7741-7751.
- Mantovani HC & Russell JB (2001) Nisin resistance of Streptococcus bovis. *Applied and environmental microbiology* **67**: 808-813.
- Mantovani HC, Kam DK, Ha JK & Russell JB (2001) The antibacterial activity and sensitivity of Streptococcus bovis strains isolated from the rumen of cattle. *FEMS Microbiology Ecology* **37**: 223-229.
- Medema MH, Blin K, Cimermancic P, de Jager V, Zakrzewski P, Fischbach MA, Weber T, Takano E & Breitling R (2011) antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic acids research* **39**: W339-W346.
- Paiva AD, Fernandes KM, Dias RS, Rocha AS, de Oliveira LL, Neves CA, de Paula SO & Mantovani HC (2012) Effects of the oral administration of viable and heat-killed Streptococcus bovis HC5 cells to pre-sensitized BALB/c mice. *PloS one* **7**: e48313.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J & Glöckner FO (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research* **41**: D590-D596.

Rea MC, Ross RP, Cotter PD & Hill C (2011) Classification of bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Prokaryotic antimicrobial peptides*, p. 29-53. Springer.

Russell JB & Mantovani HC (2002) The bacteriocins of ruminal bacteria and their potential as an alternative to antibiotics. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* **4**: 347-355.

Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press.

Seemann T (2014) Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* **btu153**.

Singh M & Sareen D (2014) Novel LanT associated lantibiotic clusters identified by genome database mining. *PloS one* **9**: e91352.

Stamatakis A, Hoover P, Rougemont J & Renner S (2008) A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. *Systematic biology* **57**: 758-771.

Tiwari U, Jadon M & Nigam D (2014) Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of methanolic leaf extract of *Callistemon viminalis*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Business Management (IJPSBM) Vol 2*.

Torrent M, Di Tommaso P, Pulido D, Nogués M, Notredame C, Boix E & Andreu D (2012) AMPA: an automated web server for prediction of protein antimicrobial regions. *Bioinformatics* **28**: 130-131.

van Heel AJ, de Jong A, Montalban-Lopez M, Kok J & Kuipers OP (2013) BAGEL3: automated identification of genes encoding bacteriocins and (non-) bactericidal posttranslationally modified peptides. *Nucleic acids research* **41**: W448-W453.

Waghu FH, Gopi L, Barai RS, Ramteke P, Nizami B & Idicula-Thomas S (2014) CAMP: Collection of sequences and structures of antimicrobial peptides. *Nucleic acids research* **42**: D1154-D1158.

Wang J, Ma H, Ge X, Zhang J, Teng K, Sun Z & Zhong J (2014) Bovicin HJ50-like lantibiotics, a novel subgroup of lantibiotics featured by an indispensable disulfide bridge. *PloS one* **9**: e97121.

Wang Z & Wang G (2004) APD: the antimicrobial peptide database. *Nucleic acids research* **32**: D590-D592.

Whitford M, McPherson M, Forster R & Teather R (2001) Identification of bacteriocin-like inhibitors from rumen *Streptococcus* spp. and isolation and characterization of bovicin 255. *Applied and environmental microbiology* **67**: 569-574.

Willey JM & Van Der Donk WA (2007) Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annu Rev Microbiol* **61**: 477-501.

Wirawan RE, Klesse NA, Jack RW & Tagg JR (2006) Molecular and genetic characterization of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. *Applied and environmental microbiology* **72**: 1148-1156.

Zhao X & Kuipers OP (2016) Identification and classification of known and putative antimicrobial compounds produced by a wide variety of Bacillales species. *BMC genomics* **17**: 882.

## CAPÍTULO 3

### GENÔMICA COMPARATIVA DE *STREPTOCOCCUS* ISOLADOS DO RÚMEN BOVINO

#### 3.1 INTRODUÇÃO

O ecossistema ruminal é altamente diverso, sendo constituído por uma densa comunidade de bactérias, arqueas, fungos, protozoários e vírus. As bactérias são os organismos mais numerosos nesse ecossistema, estando presente entre  $10^{10}$  a  $10^{11}$  UFC  $g^{-1}$  do conteúdo ruminal, constituindo mais de 50% da massa microbiana total (Creevey *et al.*, 2014). Dentre as bactérias que colonizam o rúmen e o intestino, já foi relatado que os estreptococos desempenham papel importante na acidose ruminal em animais alimentados com dietas ricas em carboidratos. Espécies de *Streptococcus* do rúmen também têm sido associadas com a produção de peptídeos antimicrobianos de baixa massa molecular, os quais possuem aplicações potenciais na manipulação de fermentação ruminal e no controle de patógenos alimentares (Azevedo *et al.*, 2015, Jans *et al.*, 2015).

*S. bovis/S. equinus* representa um complexo que inclui espécies com baixa e alta virulência, geneticamente relacionadas e frequentemente associadas a doenças como endocardite, mastite e bacteremia, com incidência tanto em humanos quanto em animais (Romero-Hernández *et al.*, 2013). Dentre as espécies comensais pertencentes a esse grupo incluem-se *S. gallolyticus*, *S. pasteurianus*, *S. lutetiensis*, *S. equinus*, *S. infantarius*, *S. macedonicus* e *S. alactolyticus*, isoladas de ambientes clínicos e do trato gastrointestinal (Jans *et al.*, 2015).

As espécies do gênero *Streptococcus* e do complexo *S.bovis/S. equinus* apresentam varias lacunas no entendimento quanto a patogenicidade e a aplicação desses organismos. Com isso, estudos de genômica comparativa vêm sendo desenvolvidos em busca de uma maior compreensão dos diversos fatores de virulência, dos mecanismos desenvolvidos na adaptação em diferentes ambientes, bem como a utilização dos recursos de cada ambiente de acordo com presença, ausência e expressão de determinados genes. *Streptococcus macedonicus*, é exemplo de bactéria pertencente ao complexo *S.bovis/S. equinus*, isolada e adaptada ao leite e hipoteticamente não

patogênica, sendo reportado que alimentos naturalmente fermentados representam um dos principais nichos ecológicos para linhagens de origem láctea (De Vuyst & Tsakalidou, 2008). Estudos *in vitro* e *in vivo* indicaram que a linhagem *S. macedonicus* ACA-DC 198 não é patogênica, tendo sido observado que a administração de altas doses da bactéria em ratos por longos períodos de tempo não afetaram o hospedeiro. Além disso, essa espécie demonstrou produção de exopolissacarídeos texturizantes e bacteriocinas anti-clostridiais (Maragkoudakis *et al.*, 2009). No entanto, *S. macedonicus* é filogeneticamente relacionado à *S. pasteurianus* e *S. infantarius* que são espécies consideradas patogênicas. Em geral, as espécies do complexo *S. bovis/S. equinus* detectadas em alimentos fermentados possuem *status* de patogenicidade não resolvido, como é o caso *S. macedonicus* e *S. infantarius*, cujos efeitos em termos de segurança alimentar e saúde pública ainda não foram estimados (Jans *et al.*, 2013, Papadimitriou *et al.*, 2014).

*S. infantarius* subsp. *infantarius* tem sido identificada em sangue, fezes e leite de humanos e animais, sendo espécies de origem clínica capazes de sintetizar proteínas pró-inflamatórias (Jans *et al.*, 2013). *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, tem sido associada com o desenvolvimento de doenças infecciosas e câncer, sendo capaz de expressar fatores de virulência como proteínas de adesão que favorecem a colonização de tecidos (Rusniok *et al.*, 2010). No entanto, algumas espécies desse grupo possuem fenótipos considerados benéficos, como características probióticas e a produção de peptídeos antimicrobianos (Papadimitriou *et al.*, 2014).

Este trabalho teve como objetivo comparar os genomas de *Streptococcus* isolados de ruminantes e espécies de importância clínica na medicina humana para avaliar a ocorrência e distribuição de fatores de virulência entre essas espécies e identificar características que possam estar associadas com a adaptação e/ou colonização do hospedeiro. Essas análises poderão auxiliar no entendimento das relações evolutivas entre linhagens patogênicas isoladas de humanos e *Streptococcus* que colonizam o trato gastrointestinal de animais.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Genomas

As sequências dos genomas parciais das espécies clínicas de *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ATCC 43143, *Streptococcus pyogenes* M1 GAS e *Streptococcus pasteurianus* ATCC 43144 foram obtidas do GenBank. Essas linhagens foram isoladas de sangue e de feridas humanas (Tabela 1) e previamente comprovadas como espécies patogênicas. Os isolados do rúmen foram obtidos de bovinos canulados da raça Nelore, pertencentes ao Setor de Bovinocultura de Corte da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Vicososa, Minas Gerais, Brasil.

**Tabela 1.** Características dos genomas das linhagens clínicas de *S. pyogenes*, *S. gallolyticus* e *S. pasteurianus* usadas para análises de genômica comparativa com espécies de *Streptococcus* ruminais utilizadas neste estudo.

Strain	Source	Accession Number*	Status	Genome Size (bp)	Ref.
<i>Streptococcus gallolyticus</i> ATCC 43143	Human blood	NC_017576.1	Complete	2,362,241	Lin IH, et al., 2011
<i>Streptococcus pyogenes</i> M1 GAS	Human wound	NC_002737.2	Complete	1,852,433	Ferretti JJ, et al. 2001
<i>Streptococcus pasteurianus</i> ATCC 43144	Human blood	AP012054.1	Complete	2,100,077	Li M, et al., 2016
<i>Streptococcus lutetiensis</i> strain 9	Nelore rumen	-	-	1,849,765	This study
<i>Streptococcus lutetiensis</i> strain 11	Nelore rumen	-	-	1,854,024	This study
<i>Streptococcus lutetiensis</i> strain 58	Nelore rumen	-	-	1,854,488	This study
<i>Streptococcus lutetiensis</i> strain 59	Nelore rumen	-	-	1,977,774	This study
<i>Streptococcus lutetiensis</i> strain 80	Nelore rumen	-	-	1,902,765	This study

\*GenBank, acesso em 02 de maio de 2017.

### 3.2.2 Alinhamento e comparação dos genomas de *Streptococcus* do rúmen e de humanos.

O software MAUVE foi utilizado para identificar regiões conservadas do genoma ou eventuais rearranjos nos cromossomos das bactérias ruminais sequenciadas. O mesmo software foi utilizado para o alinhamento dos genomas das bactérias ruminais com as bactérias patogênicas de interesse clínico. Foram feitos alinhamentos múltiplos de sequências longas, por meio da técnica de “Multiple Maximal Unique Matches” (multi-MUMs). Usando os multi-MUMs como âncoras de alinhamento, o software estendia o alinhamento até onde houvesse similaridade entre as sequências dos genomas, gerando blocos colineares (Darling *et al.*, 2010).

Para as análises comparativas, os genes foram anotados e agrupados de acordo com suas funções utilizando o servidor RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology), que organiza os genes em subsistemas, subcategorias e categorias, seguindo a estrutura SEED (<http://pubseed.theseed.org>). A função gênica foi atribuída por famílias de proteínas (FIGfams) que apresentavam funções em comum (Aziz *et al.*, 2008, Overbeek *et al.*, 2014).

O teste de Chi-Square (<http://www.quantpsy.org/chisq/chisq.htm>) foi usado para avaliar a significância (p-value < 0,05) entre o conjunto de todos os genes em todas as espécies estudadas. Observada diferença significativa entre os microrganismos, o teste Z (<http://www.socscistatistics.com/tests/ztest/Default2.aspx>) foi usado para avaliar a significância (p-value < 0,05) entre cada um dos subsistemas.

### **3.2.3 Avaliação do conteúdo gênico**

As características específicas e funcionais de cada espécie foram atribuídas nas categorias SEED usando o programa RAST (Aziz *et al.*, 2008). Para cada espécie avaliada, a anotação funcional foi atribuída por subsistemas e uma lista de características foi criada baseada na abundância gênica de cada subsistema. A lista de características foi usada para elaborar um agrupamento hierárquico (HCL) no software MEV (Multi Experiment Viewer) (Howe *et al.*, 2010). As relações funcionais foram computadas usando o “linkage method” para determinar a distância entre os *clusters* calculada pela distância Euclidiana. Os subsistemas selecionados foram avaliados manualmente.

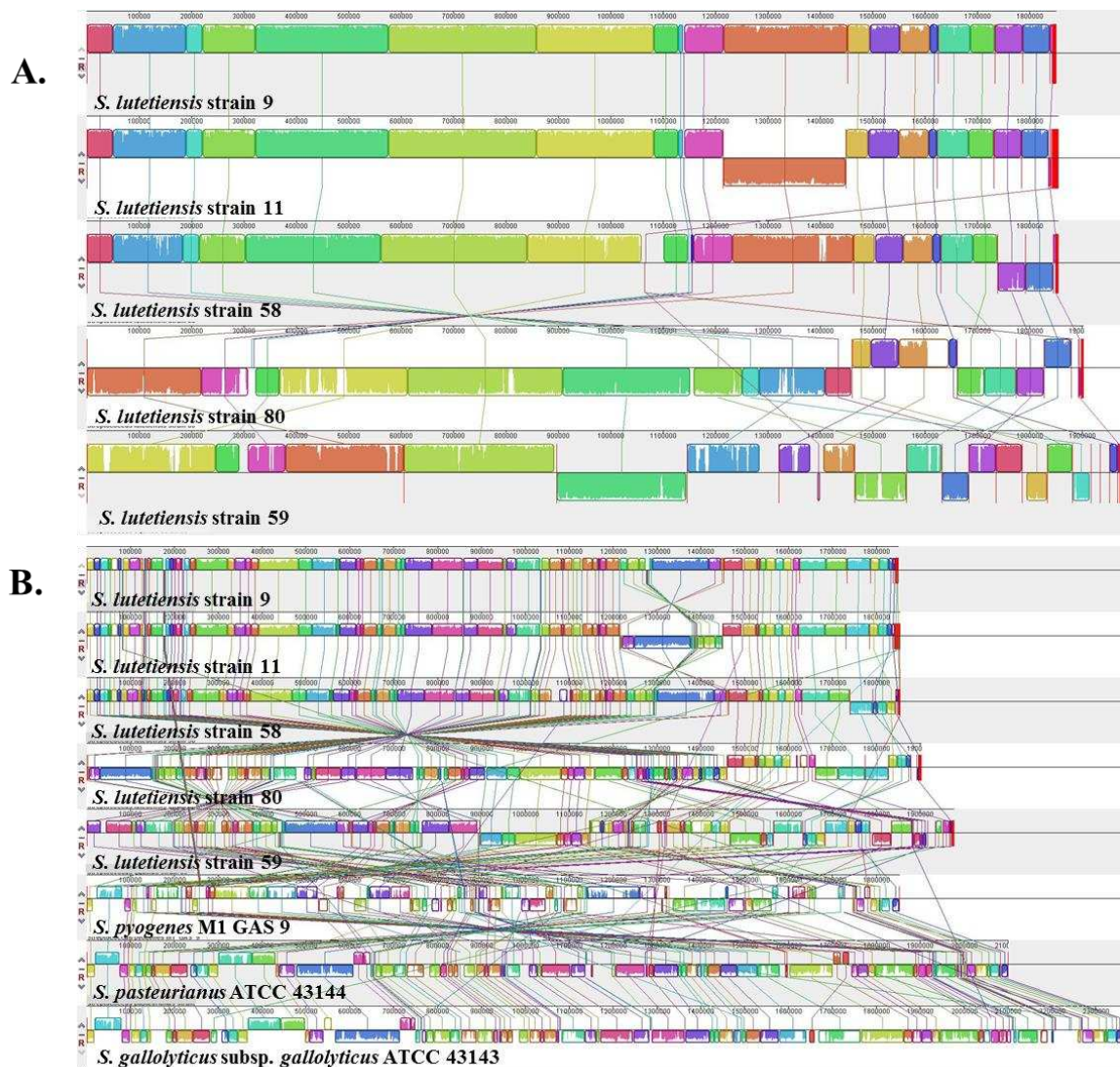
## **3.3 RESULTADOS**

### **3.3.1 Alinhamento e comparação dos genomas de *Streptococcus* do rúmen e de humanos.**

Os cinco genomas completos foram alinhados usando o *software* progressiveMAUVE (Darling *et al.*, 2010). A análise revelou um mosaico de regiões homólogas organizadas em blocos locais colineares (LBCs) entre os cinco isolados de *Streptococcus* do rúmen (Figure 3A). Foi possível observar uma similaridade, menor número de genes únicos, entre as espécies de *S. lutetiensis* (isolados 9, 11, 58 e 80) do

que destas com a espécie de *S. lutetiensis* (isolado 59). Os LBCs de sequências conservadas entre as espécies foram representados por retângulos de mesma cor e o nível de conservação foi equivalente ao nível vertical de blocos preenchidos (Figuras 3A).

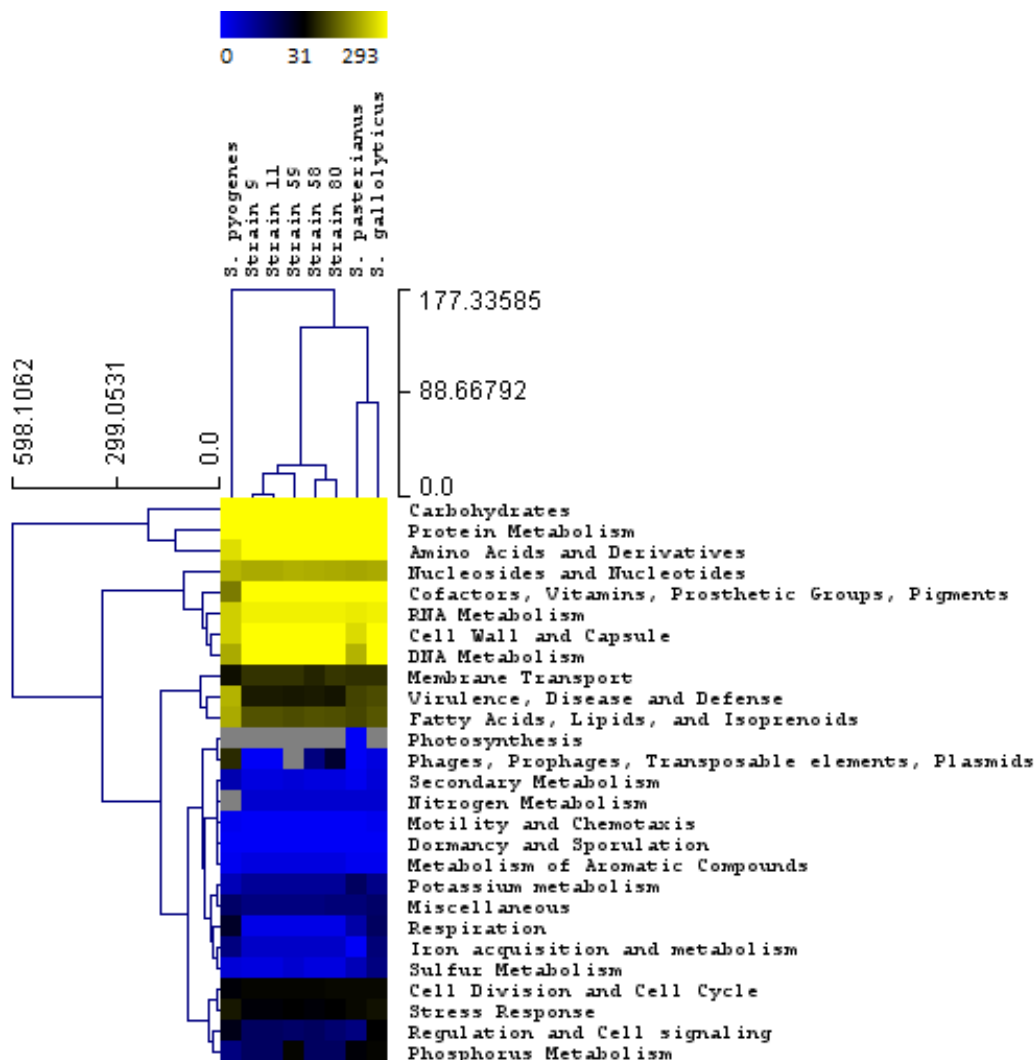
Grande parte dos LCBs foi compartilhada entre todas as espécies de *Streptococcus*, indicando que uma porção significativa da informação genética foi conservada entre todos os isolados ruminais. O número de rearranjos dos cromossomos foi mínimo entre as espécies de *S. lutetiensis* (isolados 9, 11, 58 e 80), indicado pela similaridade da posição dos LBCs entre as espécies, bem como pelo tamanho dos genomas. No entanto, algumas diferenças foram detectadas entre os genomas de *Streptococcus* analisados, particularmente na em *S. lutetiensis* 59, o qual apresentou alteração na posição e no sentido dos LBCs quando comparado às demais espécies. Alguns LBCs foram comuns apenas entre alguns isolados, enquanto outras regiões foram identificadas como espécie específica, não sendo incluídas nos LBCs. A presença de regiões únicas em cada espécie sugere eventos de inserções gênicas mediadas por transferência horizontal de genes, inversões ou deleções que podem ter desempenhado papel importante na evolução das cinco espécies analisadas (Papadimitriou *et al.*, 2014). A inclusão do genoma de espécies clínicas de *Streptococcus* (*S. pyogenes*, *S. gallolyticus* e *S. pasteurianus*) nas análises do MAUVE resultou em aumento no número de LBCs, bem como redução da média do tamanho dos blocos (Figura 3B). Isso sugere que maiores eventos de reorganização gênica ocorreram entre as três espécies clínicas quando comparado aos genomas de *Streptococcus* ruminais utilizados neste trabalho. O software progressiveMAUVE gerou um arquivo com 9010 genes ortólogos baseado no genoma dos cinco isolados ruminais, genes esses partilhados somente entre duas, três, quatro ou pelas cinco espécies estudadas. Por outro lado, após a adição das espécies clínicas houve um aumento no número de genes ortólogos que foram partilhados entre os oito genomas.



**Figura 1.** Alinhamento dos cromossomos dos isolados de *Streptococcus* calculado por progressiveMAUVE. Alinhamento dos cromossomos dos isolados ruminais de *Streptococcus lutetiensis* (isolados 9, 11, 58, 59 e 80) (A), com *Streptococcus pyogenes* M1 GAS 9, *Streptococcus pasteurianus* ATCC 43144 e *Streptococcus gallolyticus* ATCC 43143, respectivamente (B). Os blocos acima ou abaixo do cromossomo (linha preta) correspondem à orientação *forward* ou *reverse*, respectivamente; as linhas, com a mesma cor dos blocos, conectam as regiões alinhadas e podem mostrar sintenia ou rearranjos.

As diferenças entre as espécies de *Streptococcus* foram caracterizadas por meio da variação no número de genes atribuídos aos subsistemas específicos e funcionais do SEED geradas pelo software RAST (Aziz *et al.*, 2008). Essas análises foram usadas para avaliar a similaridade e o nível de divergência de genes específicos entre os cinco isolados ruminais com as três espécies clínicas estudadas. Na anotação funcional dos

genomas, as sequências dos oito microrganismos foram distribuídas em 27 subsistemas, com uma cobertura variando de 50-57% das sequências codificadoras (CDs) do genomas.



**Figura 2.** Heatmap da anotação gênica das linhagens de *Streptococcus* isolados do ecossistema ruminal e de humanos. O agrupamento hierárquico (HCL) foi realizado com os genes identificados nos 27 subsistemas identificados nas categorias SEED, usando o software MEV (Multi Experiment Viewer). A escala de cores no topo do heatmap permite a identificação do número de genes para cada microrganismo reportado. O agrupamento no topo da figura mostra a similaridade entre as espécies.

### 3.3.2 Genes envolvidos no metabolismo de carboidratos e na sobrevivência de *Streptococcus* em diferentes ambientes

O subsistema que compreende o metabolismo de carboidratos das espécies ruminais revelou de 159 a 167 genes, aproximadamente 11% dos genes com função

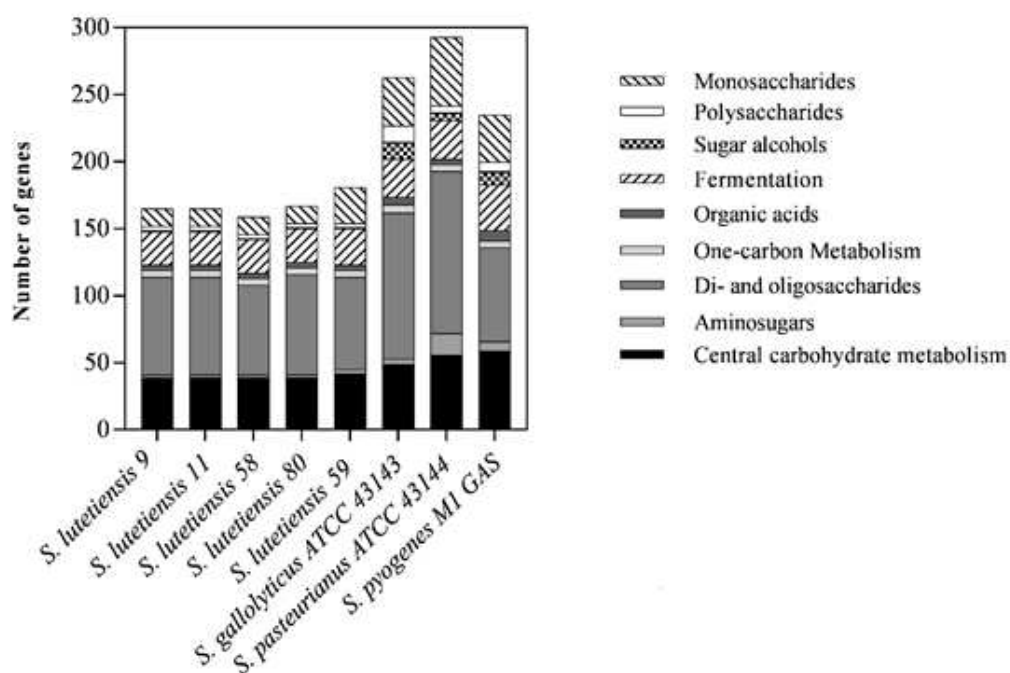
conhecida. As espécies de *Streptococcus* clínicos apresentaram maior número de genes (entre 235-263 genes) envolvidos nessas vias metabólicas, sendo que 16-19% dos genes possuem função conhecida (Figura 3).

A capacidade dos isolados de *S. lutetiensis* em utilizar amido foi relacionada com a presença de três alfa-amilases (EC 3.2.1.1), uma pullulanase (EC 3.2.1.41) e uma endo-beta-1,3-1,4 glucanase (EC 3.2.1.73), sendo que nenhuma endo-beta-1,3-1,4 glucanase foi encontrada nas espécies clínicas. Foram identificados genes para alfa-amilases e uma pullulanase envolvidos na utilização de amido pelas espécies de *S. gallolyticus*, *S. pasteurianus* e *S. pyogenes*. No metabolismo de glicogênio, apenas dois genes, que codificam para as enzimas maltodextrina fosforilase (EC 2.4.1.1) e 4-alfa-glucanotransferase (EC 2.4.1.25), foram identificados nas espécies ruminais, envolvidas na degradação das cadeias do polímero. No genoma de *S. gallolyticus* foram identificados nove genes envolvidos no metabolismo de glicogênio sendo cinco desses genes relacionados com a biossíntese de 1,4-alfa-glucano (EC 2.4.1.18), da família de adenililtransferase de glicose-1-fosfato e de ADP-glucose transglucosilase (EC 2.4.1.21), envolvidos na hidrólise das ligações ramificadas do glicogênio.

A maioria dos *Streptococcus* é capaz de utilizar lactose e catabolizar galactose (Jans *et al.*, 2015). Nesse estudo, foram avaliados os genes envolvidos no metabolismo desses carboidratos nas diferentes espécies de *Streptococcus*. Os isolados ruminais e *S. pyogenes* apresentam entre 16 e 18 genes das vias de utilização desses carboidratos, sendo que *S. pasteurianus* e *S. gallolyticus* apresentaram maior número de genes para catabolismo de lactose e galactose, com 28 e 27 genes, respectivamente. Foram identificados ortólogos para beta-galactosidase (*lacZ*) somente em *S. pasteurianus* e *S. pyogenes*. Genes para lactose e galactose permease (*lacY*), necessárias para o transporte desses substratos, foram identificados apenas nos isolados ruminais, porém lactose é metabolizada apenas no estômago do pré-ruminante, no animal adulto esse substrato não está presente no ecossistema ruminal (Baldwin *et al.*, 2004). As oito espécies estudadas apresentaram genes que codificam para os componentes IIA, IIB e IIC do sistema PEP-PTS lactose específico (Papadimitriou *et al.*, 2014). Apenas as linhagens clínicas apresentaram genes que codificam para os três componentes do sistema PEP-PTS específico para galactose, catabolizada pela via de Leloir. Os genes que codificam para galactocinase e alfa-galactosidase foram identificados em todos os genomas, exceto em *S. pyogenes*. *S. pasteurianus* e *S. gallolyticus* apresentam 121 e 109 genes, respectivamente, envolvidos na absorção e metabolismo de di- e oligossacarídeos,

enquanto as demais espécies apresentam de 67 a 75 genes associados com metabolismo de galactose.

Não foram identificados genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo de “Sugar alcohols” em nenhuma das espécies ruminais avaliadas, categoria que inclui substratos como sorbitol, manitol e glicerol, presentes em tecidos vegetais (Kawada-Matsuo *et al.*, 2016). Por outro lado, cinco genes envolvidos no transporte e metabolismo de glicerol e glicerol-3-fosfato foram encontrados nas espécies de *S. pasteurianus* e *S. gallolyticus* e nove em *S. pyogenes*. Apenas no genoma de *S. gallolyticus* foram encontrados genes envolvidos na utilização de manitol, incluindo componentes do sistema phosphotransferase específico para manitol (PTS), com presença do gene para a proteína ativadora do operon para manitol (família BglG) e manitol-1-fosfato 5-desidrogenase.

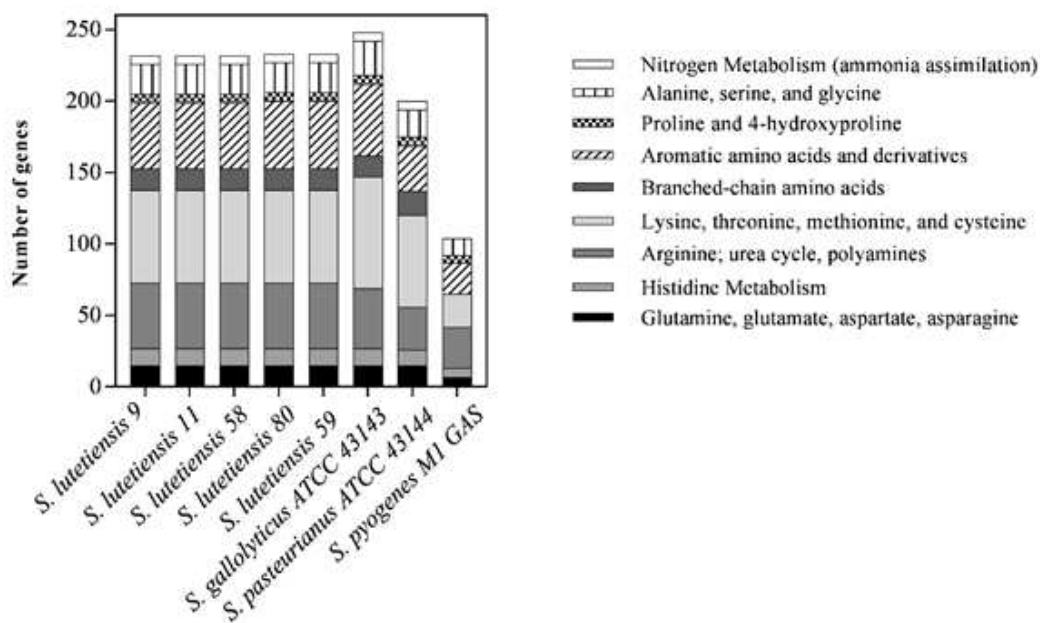


**Figura 3.** Número de genes envolvidos no metabolismo de carboidratos nos genomas de *Streptococcus* do rúmen e de humanos. A quantidade de genes presente em cada subsistema SEED foi gerada por meio da anotação funcional pelo software RAST. O tamanho da barra vertical é proporcional ao número de genes em cada microrganismo. Os genomas de *S. lutetienses* (isolados 9, 11, 58, 59 e 80) foram sequenciados nesse estudo. *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ATCC 43143 (NC\_017576.1), *S. pasteurianus* ATCC 43144 (AP012054.1) e *S. pyogenes* (NC\_002737) foram obtidos no banco de dados GenBank. (Distribuição dos genes específicos Tabela S2).

### 3.3.3 Metabolismo de “Nitrogênio, aminoácidos e derivados”

Nos oito genomas analisados, foi observada diferença significativa ( $p$ -value < 0,05) na quantidade de genes envolvidos no metabolismo de amino ácidos e nitrogênio em *S. pasteurianus* (200 genes) e *S. pyogenes* (104 genes), com relação às demais espécies (232-248 genes). *S. pyogenes* destacou-se como o genoma contendo o menor número de genes para utilização desses substratos (Figura 4). Todas as espécies apresentam 15 genes envolvidos no metabolismo de glutamina, glutamato, aspartato e asparagina, exceto *S. pyogenes* que apresentou apenas sete genes. A enzima glutamina sintetase (EC 6.3.1.2), envolvida na incorporação de amônio ao glutamato, foi identificada no genoma de todas as espécies de *Streptococcus*. As enzimas glutamato desidrogenase (EC 1.4.1.4) que catalisa a aminação redutiva do  $\alpha$ -cetoglutarato e a glutamato sintase (EC 1.4.1.13) envolvida na formação de L-glutamato a partir de glutamina e  $\alpha$ -cetoglutarato, estão presentes todas as espécies, exceto *S. pyogenes*.

Nas espécies de *S. pasteurianus* e *S. pyogenes* não foram identificados genes envolvido na síntese de triptofano. As espécies de *Streptococcus* ruminais apresentaram onze genes codificando enzimas envolvidas nesse processo, enquanto em *S. gallolyticus* foram identificados doze genes. Também foram identificados genes relacionados com o metabolismo de histidina, cisteína, prolina, glicina, alanina e serina em todas as espécies estudadas. Como demonstrado em *S. thermophilus*, bactéria com baixo requerimento por aminoácidos, a presença de vias de biossínteses de aminoácidos pode diminuir o requerimento por fontes exógenas de nitrogênio orgânico (Garault *et al.*, 2000). No entanto, o genoma de *S. pyogenes* não apresentou genes para a síntese dos aminoácidos arginina, metionina, lisina, treonina e leucina, os quais foram identificados nos genomas de todas as demais espécies analisadas.



**Figura 4** Número de genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio nos genomas de *Streptococcus* do rúmen e de humanos. A quantidade de genes presente em cada subsistema SEED foi gerada por meio da anotação funcional pelo software RAST. O tamanho da barra vertical é proporcional ao número de genes em cada microrganismo. Os genomas de *S. lutetienses* (isolados 9, 11, 58, 59 e 80) foram sequenciados nesse estudo. *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ATCC 43143 (NC\_017576.1), *S. pasteurianus* ATCC 43144 (AP012054.1) e *S. pyogenes* (NC\_002737) foram obtidos no GenBank. (Distribuição dos genes específicos Tabela S3).

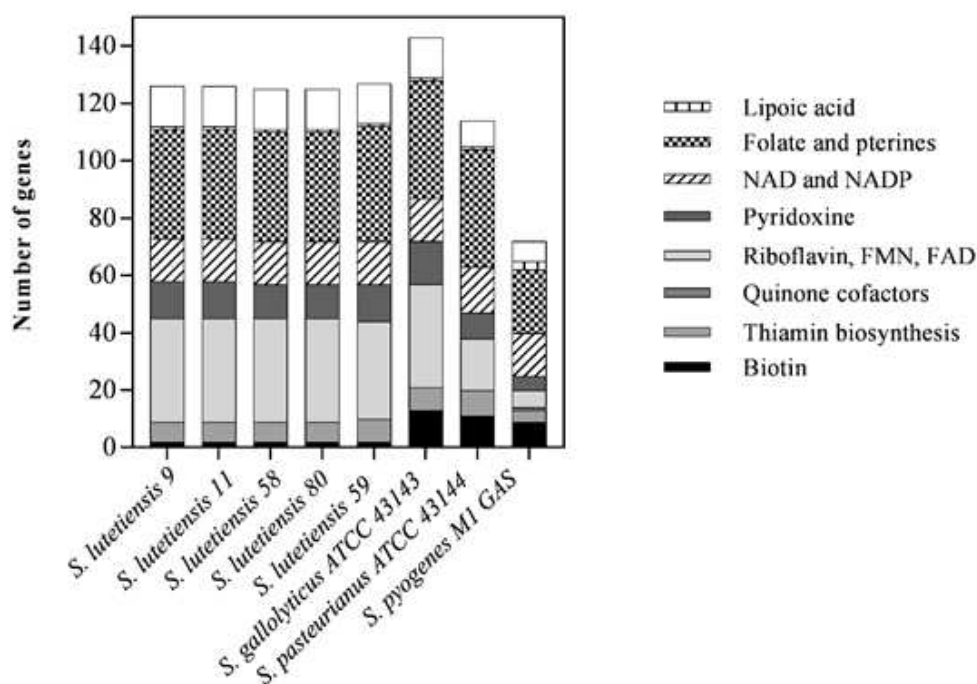
### 3.3.4 Biossíntese de vitaminas e cofatores

Algumas espécies de *Streptococcus* apresentaram vias completas ou parciais para biossíntese de vitaminas incluindo biotina (B7), tiamina (B1), riboflavina (B2), piridoxina (B6) e ácido fólico (B11-B9). *S. pyogenes* apresentou o menor número de genes relacionados a esse subsistema (72 genes), seguido por *S. pasteurianus* com 114 genes. Os demais genomas apresentaram maior número de genes para biossíntese de vitaminas (entre 125-127 genes) (Figura 5).

A riboflavina é uma vitamina essencial no metabolismo celular, sendo precursora de coenzimas como a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mono nucleotídeo (FMN), as quais atuam como carreadores de elétrons em reações redox na célula (LeBlanc *et al.*, 2011). *S. pyogenes* apresentou apenas seis genes envolvidos no metabolismo de riboflavina, dentre os quais o componente específico do substrato RibU do transportador ECF de riboflavina, FMN adeniltransferase (EC 2.7.7.2) e riboflavina cinase (EC 2.7.1.26). Todos os demais

genomas de *Streptococcus* analisados apresentaram vias mais completas, contendo de 34 a 36 genes de biossíntese de riboflavina.

Genes de biossíntese para biotina foram identificados apenas nos isolados clínicos, variando entre 11 e 13 genes. *S. lutetiensis* não apresentaram os genes, *bioD*, *bioY*, *bioB*, da via de biossíntese de biotina, sugerindo o requerimento dessa vitamina para o crescimento, o que não foi observado em *S. pasteurianus*, *S. gallolyticus* e *S. pyogenes*. No entanto, alguns genes da via de biossíntese de piridoxina e o *cluster* de biossíntese da coenzima A não foram identificados nos genomas de *S. pyogenes* e *S. pasteurianus*. Genes das vias de biossíntese de tiamina e ácido fólico estavam presentes em todos os genomas analisados, bem como genes da via de biossíntese dos cofatores NAD e NADP (15 genes em cada espécie).



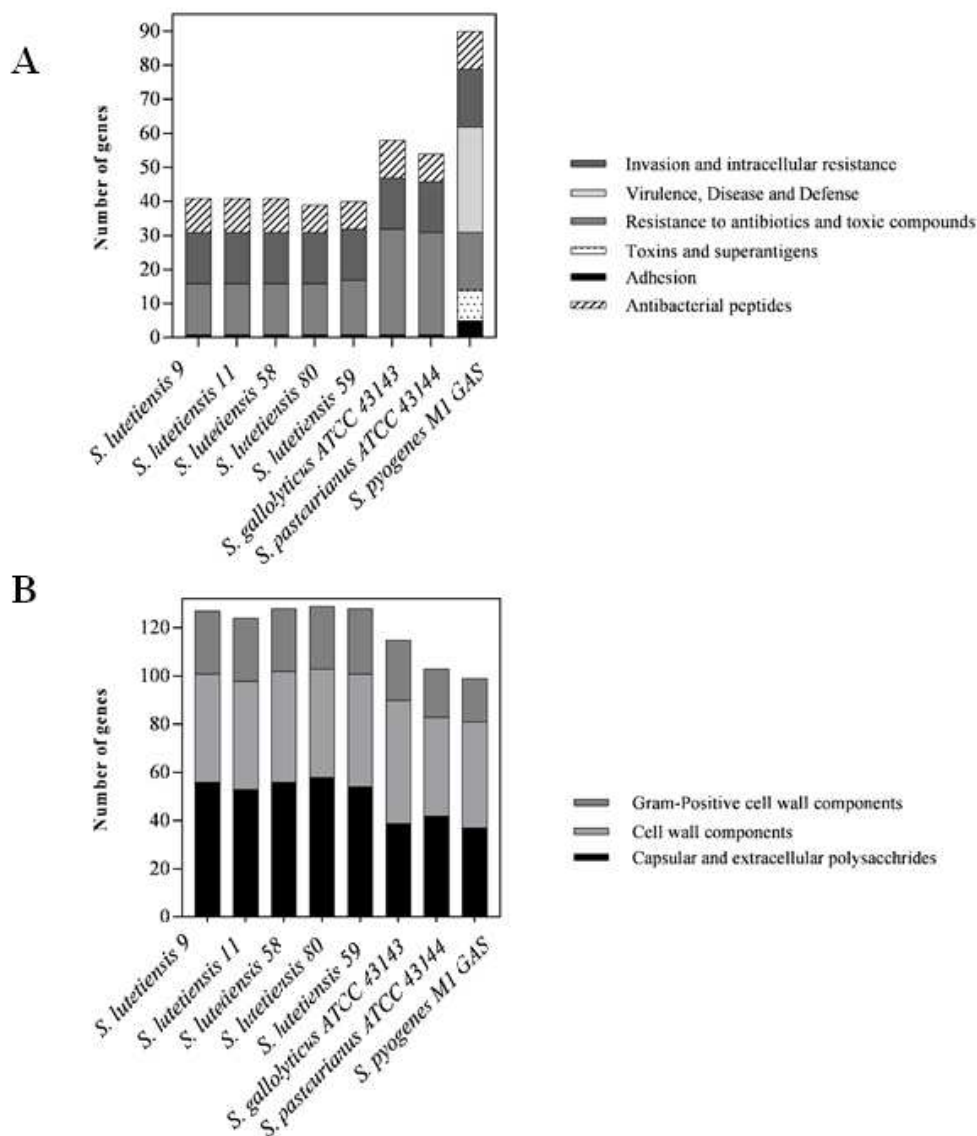
**Figura 5.** Número de genes envolvidos na biossíntese de vitaminas e cofatores nos genomas de *Streptococcus* do rúmen e de humanos. A quantidade de genes presente em cada subsistema SEED foi gerada por meio da anotação funcional pelo software RAST. O tamanho da barra vertical é proporcional ao número de genes em cada microrganismo. Os genomas de *S. lutetienses* (isolados 9, 11, 58, 59 e 80) foram sequenciados nesse estudo. *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ATCC 43143 (NC\_017576.1) , *S. pasteurianus* ATCC 43144 (AP012054.1) e *S. pyogenes* (NC\_002737) foram obtidos no GenBank. (Distribuição dos genes específicos Tabela S4).

### 3.3.5 Distribuição dos fatores de virulência

O subsistema “Virulência, doenças e defesa” agrupa genes relacionados com a adesão das bactérias ao hospedeiro, produção de toxinas, resistência a antibióticos e compostos tóxicos e a invasão celular, dentre outras características próprias de cada espécie bacteriana. O genoma de *S. pyogenes* apresentou o maior número de genes (n = 90) classificados como potenciais fatores de virulência, seguido por *S. gallolyticus* e *S. pasteurianus* com 57 e 54 genes, respectivamente. Os cinco genomas de *Streptococcus* ruminais apresentaram perfil semelhante de fatores de virulência com uma variação no número de genes entre 39 e 41 genes em cada espécie.

Vários genes foram compartilhados entre todos os genomas de *Streptococcus* analisados, incluindo os genes envolvidos na invasão celular, resistência, adesão e produção de peptídeos antibacterianos. *S. gallolyticus* (n=31) e *S. pasteurianus* (n=30) apresentam aproximadamente 54% desses genes envolvidos na resistência a antibióticos e compostos tóxicos como vancomicina (*tetM*), tetraciclina (*vncRS*) e sais biliares. Além disso, todos os genomas apresentaram pelo menos um gene (*pmrA*) de bombas de efluxo multidrogas, que podem conferir resistência a antibióticos (Waters *et al.*, 2011).

A capacidade de colonizar os tecidos do hospedeiro é uma característica importante para iniciar a infecção bacteriana. No genoma de *S. pyogenes* foram encontrados cinco genes envolvidos com o processo de adesão, dentre os quais o gene para o regulador transcricional *rofA* e genes codificadores de proteínas que interagem com fibrinectina, e chaperonina. Nos genomas de *S. gallolyticus* e *S. pasteurianus* foram encontrados os genes *pil1* e *pil3*, genes importantes na formação de pilus, bem como para construção da parede da matriz extracelular, principalmente ligados ao colágeno (Papadimitriou *et al.*, 2014). Nos genomas de *Streptococcus* do rúmen foram encontrados apenas genes de interação com chaperonina. O genoma de *S. pyogenes* apresentou genes putativos para biossíntese de ácido hialurônico (*hya*) e da proteína M (*emm*), os quais representam características típicas dos *Streptococcus* do grupo A [GAS] (Bao *et al.*, 2014), além de 40 genes relacionados a fatores de virulência específicos de *S.pyogenes*, incluindo diferentes toxinas e exotoxinas (Ibrahim *et al.*, 2016).



**Figura 6.** Número de genes envolvidos na biossíntese dos possíveis fatores de patogenicidade nos genomas de *Streptococcus* do rúmen e de humanos. (A) Características específicas relacionadas ao número de genes envolvidos em virulência, defesa e invasão celular, (B) genes envolvidos em síntese de parede celular e cápsula. A quantidade de genes presente em cada subsistema SEED foi gerada por meio da anotação funcional pelo software RAST. O tamanho da barra vertical é proporcional ao número de genes em cada microrganismo. Os genomas de *S. lutetienses* (isolados 9, 11, 58, 59 e 80) foram sequenciados nesse estudo. *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ATCC 43143 (NC\_017576.1), *S. pasteurianus* ATCC 43144 (AP012054.1) e *S. pyogenes* (NC\_002737) foram obtidos no GenBank. (Distribuição dos genes específicos Tabela S5A/B).

Não houve diferença significativa ( $p$ -value < 0.05) entre o número de genes envolvidos na biossíntese da parede celular e cápsula entre os isolados ruminais, quando comparado aos genomas de isolados humanos. Todos os genomas de *Streptococcus* apresentaram entre 41 e 51 genes envolvidos na biossíntese da parede celular. No

subsistema “Parede celular e cápsula”, todas as espécies apresentaram genes envolvidos na biossíntese do precursor do peptidoglicano (lipídeo II), incluindo quatro UDP-N-acetilmuramoilalanina ligases responsáveis pela construção da ramificação dos precursores, como descrito em *Enterococcus faecalis* (Bouhss *et al.*, 2002).

Foram encontrados de 53 a 58 genes envolvidos na biossíntese exopolissacarídeos e formação de cápsula nos genomas dos cinco isolados ruminais, sendo que esse número reduziu em torno 27,5% nos genomas das espécies de *S. gallolyticus*, *S. pasteurianus* e *S. pyogenes* (Figura 6). Em todos os isolados ruminais foram encontrados cinco genes envolvidos na síntese de exopolissacarídeos (*espA*, *espB*, *espC*, *espD*) juntamente com undecaprenil-fosfato galactose e galactose fosfotransferase (*rfbP*), reportado anteriormente em *S. thermophilus*, como responsável pela agregação e adesão da célula (Sun *et al.*, 2011). Em *S. pasteurianus* e *S. gallolyticus*, foi identificado o gene *epsA*, que possui função regulatória e os genes *epsC* e *epsD*, envolvidos na polimerização e exportação de polissacarídeos e exopolissacarídeos (Stingele *et al.*, 1996, Vendramin *et al.*, 2017). *S. gallolyticus*, *S. lutetiensis* 58 e *S. lutetienses* 59 apresentaram o gene *cpsB*, também envolvido na regulação da biossíntese de polissacarídeos. Em *S. pyogenes* só foram encontrados genes envolvidos na codificação de quatro glicosiltransferases que catalisam a síntese de exopolissacarídeos e podem contribuir para formação de biofilme.

### 3.4 DISCUSSÃO

Diferenças fenotípicas entre as espécies podem ser devidas à variação no número de genes específicos atribuídos nas categorias funcionais SEED (Vendramin *et al.*, 2017). A fim de avaliar as similaridades entre as oito linhagens de *Streptococcus*, os agrupamentos hierárquicos foram determinados pelo perfil gerado com o número de genes de cada subsistema (Figura 2). Dentre todos os subsistemas gerados pelo software RAST, cinco categorias foram investigadas visando associar o conteúdo gênico das linhagens com características adaptativas das mesmas ao hospedeiro e ao potencial patogênico de cada linhagem. Assim, foram analisados manualmente os subsistemas “Carboidratos”, “Metabolismo de nitrogênio” e “Aminoácidos e derivados”, relacionados com preferências na utilização das fontes de carbono e nitrogênio e na adaptação aos diferentes hospedeiros de acordo com a distribuição quantitativa desses genes. Além disso, foram avaliados os genes potencialmente envolvidos na biossíntese de vitaminas por meio do subsistema “Cofatores, vitaminas, grupos prostéticos e

pigmentos”. As categorias analisadas para avaliar o potencial patogênico das espécies isoladas do ecossistema ruminal quando comparadas às espécies previamente associadas a doenças humanas e animais foram “Virulência, doenças e defesa” e “Parede celular e cápsula”. Não foram observadas diferenças significativas dos genes nesses subsistemas entre os isolados ruminais, revelando alto grau de conservação entre as espécies conforme observado anteriormente no alinhamento do progressiveMAUVE (Figura 1). No entanto, foram identificadas diferenças significativas (p-value < 0,05) entre todos os subsistemas e categorias para os três isolados clínicos (Figura 2).

A comparação entre os cinco genomas ruminais, *S. lutetiensis* (isolados 9, 11, 58 e 80), *S. lutetienses* (isolado 59) e os três isolados de humanos, *S. pyogenes*, *S. gallolyticus* e *S. pasteurianus*, revelou diferenças sobre os requerimentos nutricionais e os possíveis fatores de virulência presentes nesses genomas. Nos genomas dos *Streptococcus* associados com infecções em humanos foram observadas vias metabólicas com uma maior número de genes envolvidas no metabolismo de carboidratos quando comparado aos isolados do rúmen (Figura 3). Essas diferenças podem refletir adaptações aos diferentes ecossistemas onde essas espécies são encontradas e especialização a nichos específicos. Estudos anteriores demonstraram que os estreptococos do rúmen são adaptados à utilização de amido e carboidratos solúveis, ocorrendo aumento expressivo dessas espécies em animais adaptados a dietas ricas em alimentos concentrados (Wallace, 1994).

Os genomas das espécies ruminais apresentaram muitos genes presentes nas demais espécies, no entanto, a via envolvida no metabolismo de amido tem um número maior de genes com relação às espécies clínicas. Os carboidratos não estruturais, como o amido, são digeridos principalmente no rúmen e como este é um dos componentes da dieta que mais fornecem energia aos ruminantes é muito utilizado para as produções intensivas de leite e carne (Jose *et al.*, 2017). Esses resultados, mostram uma maior adaptação dos isolados de *S. lutetiensis* ao ecossistema ruminal, podendo apresentar um maior aproveitamento do alimento ingerido. Como demonstrado em estudo anterior, algumas espécies de bactérias do rúmen possuem alta atividade proteolítica e são capazes de metabolizar carboidratos de plantas (den Bogert *et al.*, 2013, Jans *et al.*, 2015), já a qualidade e quantidade de produtos resultantes da fermentação ruminal são dependentes do tipo e atividade dos microrganismos do rúmen influenciado pelo tipo de alimentação (Jose *et al.*, 2017).

Em *Lactococcus lactis*, o potencial genético para utilizar diferentes carboidratos pode ser estimado pela presença de genes biodegradadores e transportadores relevantes, determinados após o sequenciamento do genoma (Bolotin *et al.*, 1999). Essa bactéria possui genes que a permitem assimilar diversos compostos como única fonte de carbono e energia, incluindo glicose, frutose, N-acetil glicosamina, ribose, manose, gluconato, maltose, lactose, galactose e manitol (Moineau, 1999). Características similares foram observadas nas bactérias clínicas avaliadas neste estudo, sugerindo que as mesmas apresentem uma maior flexibilidade quanto à utilização de carboidratos em relação aos isolados do rúmen (Bolotin *et al.*, 1999). Nas análises, *S. pasteurianus* apresentou as enzimas glicosil hidrolases, não presente nas demais espécies, demonstrando diferenças no catabolismo de carboidratos. Papadimitriou *et al.*, (2014) reportaram em estudo de análise comparativa realizado entre bactérias do complexo de *S. bovis/S. equinus* a presença de uma padrão similar das enzimas presentes nesse estudo. *S. macedonicus*, bem como *S. pasteurinus* apresentaram essas enzimas glicosil hidrolases, o que influenciou na habilidade dessas espécies em degradar e reconhecer fontes de carbono do meio, quando comparada as demais espécies do complexo (Papadimitriou *et al.*, 2014).

As bactérias ruminais que hidrolizam amido, fibra ou proteínas requerem altas concentrações de amônia para síntese de proteína microbiana, e muitas espécies utilizam amônia como principal fonte de nitrogênio (Sales *et al.*, 2000). Nas análises *in silico*, todos os genomas dos *Streptococcus* isolados do rúmen apresentaram um perfil similar de genes relacionados com o metabolismo de nitrogênio, aminoácidos e de seus derivados. Dentre esses, genes que codificam enzimas envolvidas diretamente na assimilação de amônia, o que indica ser esta a fonte primária de nitrogênio. Além disso, foram identificados nos genomas dessas bactérias varias enzimas que catalisam a biossíntese de diferentes aminoácidos, o que pode reduzir a necessidade de fontes exógenas de nitrogênio (Garault *et al.*, 2000). No entanto, *S. pyogenes* apresentou um número menor de genes envolvidos no metabolismo e biossíntese de aminoácidos, indicando maior dependência de obter esses nutrientes do meio para produção de biomassa (Ibrahim *et al.*, 2016). Esses resultados sugerem que existe uma relação entre o fornecimento de aminoácidos, amônia ou peptídeos com as taxas de crescimento bacteriano dessas espécies. Sales e colaboradores, 2000, investigaram os efeitos do uso de amônia e dos aminoácidos sobre o crescimento e atividade protéolítica de três espécies de bactérias do rúmen. *Butyrivibrio fibrisolvens* e *Streptococcus bovis*

apresentaram melhor crescimento, maior densidade óptica, em concentrações maiores de amônia e aminoácidos quando comparado a *Prevotella albensis*, sendo demonstrado que o crescimento dessas bactérias proteolíticas estava relacionado com a concentração de amônia e aminoácidos no meio de cultivo (Sales *et al.*, 2000). Neste trabalho, *S. gallolyticus* e *S. pausterianus* apresentaram características similares quanto à presença de genes das vias de metabolismo de nitrogênio das espécies ruminais (Figura 4).

Bactérias do ácido láctico são conhecidas como auxotróficas para a maioria dos aminoácidos (Fontaine *et al.*, 2015) e também pela capacidade variável para biossíntese de vitaminas (Gao *et al.*, 2014). Dentre os genomas avaliados neste estudo, *S. pyogenes* foi a bactéria que apresentou o menor número de genes envolvidos na biossíntese de vitaminas (Figura 5). No entanto, a falta dessas vias biossintéticas pode ser compensada pela abundância relativa de sistemas de transporte de membrana, incluindo transportadores ABC putativos, os quais possibilitam explorar outros substratos (por exemplo, peptídeos) do ambiente (Ferretti *et al.*, 2001, Ibrahim *et al.*, 2016). As vitaminas riboflavina, piridoxina, tiamina e ácido fólico são sintetizadas pelas demais bactérias auxiliando no metabolismo de açúcares, obtenção de energia como precursores de coenzimas e estimulando o crescimento.

Embora a maioria dos *Streptococcus* sejam capazes de sintetizar a maioria dos aminoácidos e vitaminas, experimentos anteriores mostraram que a maioria das linhagens de *S. bovis* possuem requerimento absoluto apenas para a biotina (Niven Jr *et al.*, 1948, Rusniok *et al.*, 2010). Assim como os isolados de *Streptococcus* do rúmen utilizados neste estudo, genes essenciais para a biossíntese de biotina, não foram encontrados nas linhagens utilizadas naquele estudo, indicando a necessidade de obtenção desta vitamina por meio da dieta. A biotina é um cofator da enzima metilmalonil-CoA-carboxitransferase, que catalisa uma das etapas da via de síntese do ácido propiônico (Relling & Reynolds, 2007). Essa enzima está envolvida com a gliconeogênese, com o metabolismo do propionato, com a síntese de ácidos graxos e com a degradação de aminoácidos. Nos ruminantes, a taxa de gluconeogênese aumenta com a ingestão alimentar, e um dos principais precursores para essa via é o ácido propiônico (Baldwin & Allison, 1983). A utilização metabólica de ácido propiônico após a sua absorção a partir do trato gastrointestinal é dependente da transformação do propionato em succinil-coenzima A, por meio de enzimas dependentes da biotina e do ácido fólico (Relling & Reynolds, 2007).

A patogenicidade e a virulência dependem de múltiplos fatores como adesão, resistência às respostas do sistema imune e outros mecanismos de defesas do hospedeiro, invasão, translocação e produção de toxina e citotoxinas (Jans *et al.*, 2015). Os cinco genomas dos *Streptococcus* ruminais apresentaram menor número de genes classificados como fatores de virulência quando comparado aos três genomas de *Streptococcus* isolados de humanos (Figura 6). Dentre esses, não foram identificados genes envolvidos em vias de produção de toxinas e exotoxinas nos isolados ruminais. Como observado nas análises *in silico*, *S. pyogenes* GAS M1 apresentou o maior número de genes relacionados a fatores de virulência com um grupo específico de genes envolvidos na produção de exotoxinas (Figura 6).

Segundo Wong & Yuen (2012), a transferência horizontal de genes é comum em algumas linhagens de *S. pyogenes*, dando-lhes plasticidade e variação genômica. Esses fatores coletivamente conferem virulência e capacidade de resistência adicionais e alteram a regulação de genes existentes (Wong & Yuen, 2012). O gene *emm*, que codifica a proteína M contém regiões conservadas, semi-conservadas e hipervariáveis e pode ser usado como marcador epidemiológico para GAS. A ocorrência de *emm* entre as linhagens de GAS tem sido ligada à localização geográfica (Steer *et al.*, 2009, Ibrahim *et al.*, 2016). Além disso, glucosiltransferase são enzimas que sintetizam o glucano do exopolissacarídeo (EPS) a partir de sacarose, contribuindo assim para a formação de biofilmes, além de ajudar na capacidade de adesão *in vivo* (Steer *et al.*, 2009, Jans *et al.*, 2015), enzimas presentes no *S. pyogenes*.

Nas análises, foi observado maior número de genes envolvidos na produção de exopolissacarídeos nos genomas de *Streptococcus* do rúmen (Figura 6B), que podem estar relacionados com o fato dos mesmos serem isolados recentes, submetidos a poucas transferências *in vitro*, quando comparado aos isolados humanos, ou mesmo pelas diferenças na origem e cultivo das espécies. Já foi observado que bactérias mantidas cultivadas por longos períodos de tempo, em condições laboratoriais, podem perder ou reduzir a capacidade de produção desses polímeros por normalmente apresentarem condições ótimas para crescimento (Schembri *et al.*, 2004). Segundo De Vuyst *et al.*, (1998), ao analisar as fontes nutricionais, reportou que o aumento das concentrações de carbono e nitrogênio favoreceu maiores produções de exopolissacarídeos em estudo com *S. thermophilus* LY03, sob condições ótimas de cultivo (De Vuyst *et al.*, 1998). Em outro estudo, com bactérias do ácido láctico foi reportado que a manutenção do pH próximo à neutralidade pode resultar no aumento da produção de exopolissacarídeos por

estender o tempo da cultura na fase exponencial de crescimento. (Gassem *et al.*, 1997). A produção de exopolissarídeos por *Streptococcus* comensais ou patogênicos tem sido envolvida diretamente nas interações com o hospedeiro, requerida para a evasão do sistema imunológico ou mesmo para adesão e colonização do trato gastro intestinal (Hill, 2012), o que pode favorecer as bactérias ruminais.

Os resultados de genômica comparativa de *Streptococcus* do rúmen e linhagens de origem humana permitiram inferir que os isolados ruminais apresentam uma adaptação ao ambiente ruminal com uma maior afinidade a carboidratos estruturais, quando comparado as espécies isoladas de humanos. Os isolados clínicos apresentaram uma maior quantidade de genes envolvidos nos fatores de virulência, assim como produção de características importantes para o desenvolvimento de determinadas doenças, a exemplo a produção de toxinas e exotoxinas. As análises nos permite inferir que as espécies evoluíram de acordo com o ecossistema e as necessidades de colozinação do hospedeiro, podendo esta ligado a conservação ou perda de determinados grupos de genes específicos.

### 3.5 CONCLUSÕES

As espécies de *Streptococcus* isoladas de humanos apresentaram alta reorganização gênica, sugerindo maior distância evolutiva entre essas espécies.

As espécies de *S. gallolyticus*, *S. pasteurianos* e *S. pyogenes* apresentam maior número de genes envolvidos no metabolismo de carboidratos, em relação aos isolados ruminais.

Os *Streptococcus* isolados do rúmen apresentaram maior diversidade de genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio e biossíntese de vitaminas em relação aos isolados oriundos de humanos.

Os *Streptococcus* ruminais não apresentaram vários fatores de virulência conservados em *S. gallolyticus*, *S. pasteurianos* e *S. pyogenes*.

*S. pyogenes* apresentou maior diversidade de genes de virulência entre os isolados avaliados.

Os *Streptococcus* ruminais não apresentaram genes envolvidos na produção de toxinas e exotoxinas, fenótipo presente apenas em *S. pyogenes*.

### 3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Azevedo AC, Bento CB, Ruiz JC, Queiroz MV & Mantovani HC (2015) Distribution and genetic diversity of bacteriocin gene clusters in rumen microbial genomes. *Applied and environmental microbiology* **81**: 7290-7304.

Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM & Kubal M (2008) The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC genomics* **9**: 75.

Baldwin R & Allison M (1983) Rumen metabolism. *Journal of Animal Science* **57**: 461-477.

Baldwin R, McLeod K, Klotz J & Heitmann R (2004) Rumen development, intestinal growth and hepatic metabolism in the pre-and postweaning ruminant. *Journal of Dairy Science* **87**: E55-E65.

Bao Y, Liang Z, Booyjzsen C, Mayfield JA, Li Y, Lee SW, Ploplis VA, Song H & Castellino FJ (2014) Unique genomic arrangements in an invasive serotype M23 strain of *Streptococcus pyogenes* identify genes that induce hypervirulence. *Journal of bacteriology* **196**: 4089-4102.

Bolotin A, Mauger S, Malarme K, Ehrlich SD & Sorokin A (1999) Low-redundancy sequencing of the entire *Lactococcus lactis* IL1403 genome. *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*, p. 27-76. Springer.

Bouhss A, Josseaume N, Severin A, Tabei K, Hugonnet J-E, Shlaes D, Mengin-Lecreulx D, van Heijenoort J & Arthur M (2002) Synthesis of the L-alanyl-L-alanine cross-bridge of *Enterococcus faecalis* peptidoglycan. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 45935-45941.

Creevey CJ, Kelly WJ, Henderson G & Leahy SC (2014) Determining the culturability of the rumen bacterial microbiome. *Microbial biotechnology* **7**: 467-479.

Darling AE, Mau B & Perna NT (2010) progressiveMauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PloS one* **5**: e11147.

De Vuyst L & Tsakalidou E (2008) *Streptococcus macedonicus*, a multi-functional and promising species for dairy fermentations. *International Dairy Journal* **18**: 476-485.

De Vuyst L, Vanderveken F, Van de Ven S & Degeest B (1998) Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. *Journal of Applied Microbiology* **84**: 1059-1068.

den Bogert Bv, Erkus O, Boekhorst J, Goffau Md, Smid EJ, Zoetendal EG & Kleerebezem M (2013) Diversity of human small intestinal *Streptococcus* and *Veillonella* populations. *FEMS microbiology ecology* **85**: 376-388.

Ferretti JJ, McShan WM, Ajdic D, Savic DJ, Savic G, Lyon K, Primeaux C, Sezate S, Suvorov AN & Kenton S (2001) Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 4658-4663.

Fontaine L, Wahl A, Flécharde M, Mignolet J & Hols P (2015) Regulation of competence for natural transformation in streptococci. *Infection, Genetics and Evolution* **33**: 343-360.

Gao X-Y, Zhi X-Y, Li H-W, Klenk H-P & Li W-J (2014) Comparative genomics of the bacterial genus *Streptococcus illuminates* evolutionary implications of species groups. *PloS one* **9**: e101229.

Garault P, Letort C, Juillard V & Monnet V (2000) Branched-chain amino acid biosynthesis is essential for optimal growth of *Streptococcus thermophilus* in milk. *Applied and environmental microbiology* **66**: 5128-5133.

Gassem M, Schmidt K & Frank J (1997) Exopolysaccharide production from whey lactose by fermentation with *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. *Journal of Food Science* **62**: 171-173.

Hill C (2012) Virulence or niche factors: what's in a name? *Journal of bacteriology* **194**: 5725-5727.

Howe E, Holton K, Nair S, Schlauch D, Sinha R & Quackenbush J (2010) Mev: multiexperiment viewer. *Biomedical informatics for cancer research*, pp. 267-277. Springer.

Ibrahim J, Eisen JA, Jospin G, Coil DA, Khazen G & Tokajian S (2016) Genome Analysis of *Streptococcus pyogenes* Associated with Pharyngitis and Skin Infections. *PloS one* **11**: e0168177.

Jans C, Meile L, Lacroix C & Stevens MJ (2015) Genomics, evolution, and molecular epidemiology of the *Streptococcus bovis/Streptococcus equinus* complex (SBSEC). *Infection, Genetics and Evolution* **33**: 419-436.

Jans C, Follador R, Hochstrasser M, Lacroix C, Meile L & Stevens MJ (2013) Comparative genome analysis of *Streptococcus infantarius subsp. infantarius* CJ18, an African fermented camel milk isolate with adaptations to dairy environment. *BMC genomics* **14**: 200.

Jose VL, More RP, Appoorthy T & Arun AS (2017) In depth analysis of rumen microbial and carbohydrate-active enzymes profile in Indian crossbred cattle. *Systematic and Applied Microbiology* **40**: 160-170.

Kawada-Matsuo M, Oogai Y & Komatsuzawa H (2016) Sugar Allocation to Metabolic Pathways is Tightly Regulated and Affects the Virulence of *Streptococcus mutans*. *Genes* **8**: 11.

LeBlanc J, Laiño J, del Valle MJ, Vannini V, Van Sinderen D, Taranto M, de Valdez G, de Giori GS & Sesma F (2011) B-Group vitamin production by lactic acid bacteria—current knowledge and potential applications. *Journal of Applied Microbiology* **111**: 1297-1309.

Maragkoudakis PA, Papadelli M, Georgalaki M, Panayotopoulou EG, Martinez-Gonzalez B, Mentis AF, Petraki K, Sgouras DN & Tsakalidou E (2009) In vitro and in vivo safety evaluation of the bacteriocin producer *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. *International journal of food microbiology* **133**: 141-147.

Moineau S (1999) Applications of phage resistance in lactic acid bacteria. *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications: Proceedings of the Sixth Symposium on lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications, 19–23 September 1999, Veldhoven, The Netherlands*, (Konings WN, Kuipers OP & In 't Veld JHJH, eds.), pp. 377-382. Springer Netherlands, Dordrecht.

Niven Jr C, Washburn MR & White J (1948) Nutrition of *Streptococcus bovis*. *Journal of bacteriology* **55**: 601.

Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Parrello B & Shukla M (2014) The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic acids research* **42**: D206-D214.

Papadimitriou K, Anastasiou R, Mavrogonatou E, Blom J, Papandreou NC, Hamodrakas SJ, Ferreira S, Renault P, Supply P & Pot B (2014) Comparative genomics of the dairy isolate *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 against related members of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex. *BMC genomics* **15**: 272.

Relling A & Reynolds C (2007) Feeding rumen-inert fats differing in their degree of saturation decreases intake and increases plasma concentrations of gut peptides in lactating dairy cows. *Journal of dairy science* **90**: 1506-1515.

Romero-Hernández B, del Campo R & Cantón R (2013) *Streptococcus bovis*, taxonomic status, clinical relevance and antimicrobial susceptibility. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica* **31**: 14-19.

Rusniok C, Couvé E, Da Cunha V, El Gana R, Zidane N, Bouchier C, Poyart C, Leclercq R, Trieu-Cuot P & Glaser P (2010) Genome sequence of *Streptococcus gallolyticus*: insights into its adaptation to the bovine rumen and its ability to cause endocarditis. *Journal of bacteriology* **192**: 2266-2276.

Rusniok C, Couve E Fau - Da Cunha V, Da Cunha V Fau - El Gana R, El Gana R Fau - Zidane N, Zidane N Fau - Bouchier C, Bouchier C Fau - Poyart C, Poyart C Fau - Leclercq R, Leclercq R Fau - Trieu-Cuot P, Trieu-Cuot P Fau - Glaser P & Glaser P (2010) Genome sequence of *Streptococcus gallolyticus*: insights into its adaptation to the bovine rumen and its ability to cause endocarditis. *Journal of Bacteriology*.

Sales M, Lucas F & Blanchart G (2000) Effects of ammonia and amino acids on the growth and proteolytic activity of three species of rumen bacteria: *Prevotella albensis*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, and *Streptococcus bovis*. *Current microbiology* **40**: 380-386.

Schembri MA, Dalsgaard D & Klemm P (2004) Capsule shields the function of short bacterial adhesins. *Journal of bacteriology* **186**: 1249-1257.

Steer AC, Law I, Matatolu L, Beall BW & Carapetis JR (2009) Global emm type distribution of group A streptococci: systematic review and implications for vaccine development. *The Lancet infectious diseases* **9**: 611-616.

Stingele F, Neeser J-R & Mollet B (1996) Identification and characterization of the eps (Exopolysaccharide) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *Journal of bacteriology* **178**: 1680-1690.

Sun Z, Chen X, Wang J, Zhao W, Shao Y, Wu L, Zhou Z, Sun T, Wang L & Meng H (2011) Complete genome sequence of *Streptococcus thermophilus* strain ND03. *Journal of bacteriology* **193**: 793-794.

Vendramin V, Treu L, Campanaro S, Lombardi A, Corich V & Giacomini A (2017) Genome comparison and physiological characterization of eight *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Italian dairy products. *Food microbiology* **63**: 47-57.

Wallace R (1994) Ruminant microbiology, biotechnology, and ruminant nutrition: progress and problems. *Journal of Animal Science* **72**: 2992-3003.

Waters AE, Contente-Cuomo T, Buchhagen J, Liu CM, Watson L, Pearce K, Foster JT, Bowers J, Driebe EM & Engelthaler DM (2011) Multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in US meat and poultry. *Clinical Infectious Diseases* **52**: 1227-1230.

Wong SS & Yuen K-Y (2012) *Streptococcus pyogenes* and re-emergence of scarlet fever as a public health problem. *Emerging microbes & infections* **1**: e2.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

**Tabela S1.** *Screening* inicial dos 463 isolados bacterianos provenientes do rumen de bovinos Nelore alimentados com forrageiras tropicais (meio mínimo (MM), meio semissintético (SS) e meio complexo (MC)). As quatro bactérias indicadoras, *Enterococcus faecalis* ATCC 4083, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* ATCC 355, foram cultivadas em meio BHI a 37 °C e análise qualitativa dos halos de inibição foi monitorada após incubação *overnight*. Em destaque os isolados selecionados (n=106).

Meio/Isolado	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 4083	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 1934	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> ATCC 355
SS1	-	-	-	-
SS2	-	-	+	-
SS3	-	-	-	-
SS4	-	-	-	-
SS5	-	-	-	-
SS6	-	-	+	-
SS7	-	-	-	-
<b>SS8</b>	+	-	-	+
SS9	-	-	-	-
SS10	-	-	+	-
SS11	-	-	+	-
SS12	-	-	-	-
SS13	-	-	-	-
SS14	-	-	-	-
SS15	-	-	-	-
SS16	-	-	-	+
SS17	-	-	+	-
SS18	-	-	-	-
SS19	+	-	-	-
SS20	+	-	-	-
SS21	-	-	+	-
SS22	-	-	-	-
SS23	-	-	+	-
SS24	-	-	-	-

**Continuação tabela S1.**

Meio/Isolado	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 4083	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 1934	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> ATCC 355
SS25	-	-	-	-
SS26	-	-	-	+
SS27	-	-	-	-
SS28	-	-	-	-
SS29	-	-	-	-
SS30	-	-	-	-
SS31	-	-	-	-
SS32	-	-	-	-
SS33	-	-	-	-
SS34	-	-	-	-
SS35	-	-	-	+
SS36	-	+	-	-
SS37	-	-	-	-
SS38	-	-	-	-
SS39	-	-	-	-
SS40	-	-	+	-
<b>SS41</b>	-	+	+	-
SS42	-	-	-	-
SS43	-	-	-	-
SS44	-	-	-	-
<b>SS45</b>	-	+	+	+
SS46	-	-	-	-
<b>SS47</b>	-	-	+	+
SS48	-	-	+	-
<b>SS49</b>	-	-	+	+
<b>SS50</b>	-	+	-	+
SS51	-	-	-	+
<b>SS52</b>	+	-	-	+
SS53	-	-	-	+
SS54	-	-	-	-

**Continuação tabela S1.**

Meio/Isolado	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 4083	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 1934	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> ATCC 355
SS55	-	-	-	+
SS56	-	-	-	+
SS57	-	-	-	+
SS58	-	-	-	-
<b>SS59</b>	-	+	-	-
SS60	-	-	-	-
SS61	-	-	-	-
SS62	-	-	-	-
SS63	-	-	-	-
SS64	-	-	-	-
<b>SS65</b>	-	+	+	-
SS66	-	-	-	-
SS67	-	+	-	-
SS68	-	-	-	-
SS69	-	-	-	-
SS70	-	-	-	-
<b>SS71</b>	-	+	-	-
SS72	-	-	-	-
SS73	-	-	-	-
<b>SS74</b>	-	+	+	-
SS75	-	-	-	-
SS76	-	-	-	-
SS77	-	-	-	-
SS78	-	-	-	-
SS79	-	-	-	-
SS80	-	-	-	-
SS81	+	-	-	-
SS82	-	-	-	-
SS83	-	-	-	-
SS84	-	-	-	-

**Continuação tabela S1.**

Meio/Isolado	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 4083	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 1934	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> ATCC 355
SS85	-	-	-	-
<b>SS86</b>	-	-	-	+
SS87	-	-	-	-
SS88	-	-	-	-
<b>SS89</b>	+	-	-	+
<b>SS90</b>	+	+	+	+
<b>SS91</b>	+	+	+	-
SS92	-	-	+	-
<b>SS93</b>	+	+	+	+
<b>SS94</b>	+	+	+	+
<b>SS95</b>	-	+	+	+
SS96	-	-	-	-
<b>SS97</b>	+	+	+	+
<b>SS98</b>	+	+	+	+
<b>SS99</b>	-	+	+	+
SS100	-	-	+	-
<b>SS101</b>	-	+	-	+
<b>SS102</b>	-	+	+	+
<b>SS103</b>	-	+	+	+
SS104	-	-	+	-
SS105	-	-	-	-
SS106	-	+	-	-
SS107	-	-	-	-
SS108	-	-	-	+
SS109	-	-	-	-
SS110	-	-	-	-
SS111	-	-	-	-
SS112	-	-	-	+
SS113	-	-	-	-
SS114	-	-	-	-

**Continuação tabela S1.**

Meio/Isolado	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 4083	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 1934	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> ATCC 355
SS115	-	-	-	-
SS116	-	-	-	-
SS117	-	-	-	-
SS118	-	-	-	-
SS119	-	-	-	-
SS120	-	-	+	-
SS121	-	-	-	-
SS122	-	-	-	-
SS123	-	-	-	-
SS124	-	-	-	-
<b>SS125</b>	+	-	+	-
SS126	+	-	-	-
SS127	+	-	-	-
<b>SS128</b>	+	-	+	+
SS129	-	-	-	+
SS130	-	-	-	-
<b>SS131</b>	-	+	-	-
SS132	-	-	-	-
SS133	-	-	-	-
SS134	-	-	-	-
<b>SS135</b>	+	-	-	+
SS136	-	-	-	+
SS137	-	-	-	-
SS138	-	-	-	-
SS139	-	-	-	-
SS140	-	-	-	+
SS141	-	-	-	-
SS142	-	-	-	-
SS143	-	-	-	+
SS144	-	-	-	-

**Continuação tabela S1.**

Meio/Isolado	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 4083	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 1934	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> ATCC 355
SS145	-	-	-	-
SS146	-	-	-	-
<b>SS147</b>	-	+	+	-
<b>SS148</b>	-	+	+	-
SS149	-	+	-	-
SS150	-	-	-	-
SS151	-	+	-	-
<b>SS152</b>	-	+	++	-
<b>SS153</b>	-	+	-	+
<b>SS154</b>	-	+	+	-
SS155	-	+	-	-
SS156	-	+	-	-
SS157	-	-	-	-
SS158	-	-	-	-
SS159	-	+	-	-
SS160	-	-	+	-
SS161	-	-	-	-
MM1	-	-	-	-
<b>MM2</b>	+	+	+	+
MM3	-	+	-	-
MM4	-	-	-	-
MM5	-	-	-	-
MM6	-	-	-	-
MM7	-	-	-	-
MM8	-	-	-	-
MM9	-	+	-	-
MM10	-	-	-	-
MM11	-	-	-	-
MM12	-	-	-	-
MM13	-	-	-	-

**Continuação tabela S1.**

Meio/Isolado	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 4083	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 1934	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> ATCC 355
MM14	-	-	+	-
MM15	-	-	-	-
MM16	-	-	-	-
MM17	-	-	-	-
<b>MM18</b>	-	+	+	-
<b>MM19</b>	-	+	+	-
<b>MM20</b>	-	+	-	-
<b>MM21</b>	-	-	+	-
<b>MM22</b>	-	-	+	-
MM23	-	-	+	-
MM24	-	-	-	-
MM25	-	-	-	+
MM26	-	-	-	-
<b>MM27</b>	-	-	+	+
<b>MM28</b>	-	+	+	+
<b>MM29</b>	+	+	+	-
MM30	+	-	-	-
MM31	-	+	-	-
MM32	-	+	-	+
MM33	-	+	-	+
MM34	-	-	-	-
MM35	-	-	-	-
MM36	-	+	-	-
MM37	-	+	-	-
<b>MM38</b>	+	+	+	+
MM39	-	-	-	+
MM40	-	-	-	-
MM41	-	+	-	+
MM42	-	+	-	-
<b>MM43</b>	-	+	-	+

Continuação tabela S1.

Meio/Isolado	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 4083	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 1934	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> ATCC 355
MM44	-	-	-	+
MM45	-	-	-	-
MM46	-	+	-	-
MM47	-	+	-	-
MM48	-	-	-	-
MM49	+	-	-	-
MM50	+	-	-	-
MM51	-	-	-	-
MM52	+	-	-	-
MM53	+	-	-	-
MM54	-	-	-	+
MM55	-	-	-	+
MM56	-	-	-	-
MM57	-	-	-	+
MM58	+	-	-	-
MM59	-	-	-	-
MM60	-	-	+	+
<b>MM61</b>	+	-	-	+
<b>MM62</b>	-	-	-	+
<b>MM63</b>	+	+	-	+
MM64	-	-	-	-
MM65	-	-	-	-
<b>MM66</b>	+	-	-	+
<b>MM67</b>	+	+	+	+
<b>MM68</b>	+	-	-	+
MM69	-	-	-	+
<b>MM70</b>	+	-	+	+
MM71	-	-	-	-
<b>MM72</b>	+	+	-	+
<b>MM73</b>	+	-	+	-

Continuação tabela S1.

Meio/Isolado	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 4083	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 1934	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> ATCC 355
MM74	-	-	-	-
MM75	-	+	-	-
<b>MM76</b>	+	+	-	-
<b>MM77</b>	+	+	+	-
<b>MM78</b>	+	+	+	-
<b>MM79</b>	+	+	+	-
MM80	-	-	-	-
MM81	+	-	-	-
MM82	-	-	-	-
MM83	-	-	-	-
MM84	-	-	-	-
MM85	+	-	-	-
MM86	-	-	-	-
MM87	-	-	-	+
MM88	-	-	-	-
MM89	+	-	-	-
MM90	+	-	-	-
MM91	+	-	-	-
MM92	-	-	-	+
MM93	-	-	-	-
MM94	-	-	-	-
MM95	+	-	-	-
MM96	-	-	-	-
<b>MM97</b>	-	+	-	+
<b>MM98</b>	+	+	-	-
<b>MM99</b>	-	+	-	-
MM100	+	-	-	+
MM101	+	-	-	+
MM102	+	-	-	+
MM103	-	-	-	+

**Continuação tabela S1.**

Meio/Isolado	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 4083	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 1934	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> ATCC 355
<b>MM104</b>	+	-	+	-
<b>MM105</b>	+	-	-	+
MM106	-	-	-	-
MM107	-	-	-	-
MM108	+	+	-	-
MM109	-	-	-	-
MM110	-	+	-	+
<b>MM111</b>	+	-	+	+
MM112	-	+	-	-
MM113	-	+	-	-
MM114	-	-	-	-
<b>MM115</b>	+	+	+	+
MM116	-	+	-	-
<b>MM117</b>	+	+	-	-
<b>MM118</b>	+	+	-	-
<b>MM119</b>	-	-	+	+
MM120	-	-	-	-
MM121	+	-	-	-
MM122	-	-	-	-
MM123	-	-	-	-
MM124	-	-	-	-
MM125	-	-	-	-
MM126	-	-	-	-
MM127	-	-	+	-
MM128	-	-	-	-
MM129	-	-	-	-
MM130	-	-	-	-
MM131	-	-	+	-
MM132	-	-	+	-
MM133	-	-	-	-

Continuação tabela S1.

Meio/Isolado	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 4083	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 1934	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> ATCC 355
MM134	-	-	-	-
MM135	-	-	+	+
<b>MM136</b>	-	+	+	+
MM137	-	-	+	+
MM138	-	-	-	-
MM139	-	-	-	-
MM140	+	+	-	-
MM141	-	-	-	-
MM142	-	-	+	-
MM143	+	+	-	-
MM144	-	-	-	-
<b>MM145</b>	+	+	-	+
MM146	-	-	-	-
<b>MM147</b>	+	+	-	-
MM148	-	-	-	-
MM149	-	-	-	-
MM150	+	-	-	-
MM151	-	-	-	-
MM152	+	-	-	-
MM153	-	-	-	-
MM154	-	-	-	-
MM155	+	+	-	-
MM156	+	-	+	-
MM157	+	-	-	-
MM158	-	-	-	-
MM159	+	-	-	-
<b>MC1</b>	+	+	-	+
<b>MC2</b>	-	+	+	+
MC3	-	+	-	-
MC4	-	+	-	+

Continuação tabela S1.

Meio/Isolado	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 4083	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 1934	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> ATCC 355
MC5	-	+	-	+
MC6	-	+	-	+
MC7	+	+	-	-
<b>MC8</b>	+	+	+	+
<b>MC9</b>	+	+	+	+
<b>MC10</b>	+	+	+	+
MC11	-	+	-	-
MC12	-	-	-	-
MC13	-	-	-	-
<b>MC14</b>	+	+	+	+
MC15	-	+	-	-
MC16	-	+	-	-
MC17	-	+	-	-
MC18	-	-	-	-
MC19	-	+	+	-
MC20	-	-	+	-
MC21	-	-	-	-
<b>MC22</b>	+	+	-	+
<b>MC23</b>	+	+	-	+
<b>MC24</b>	+	+	-	+
MC25	-	-	-	-
MC26	-	-	-	-
MC27	-	-	-	+
MC28	-	+	-	+
MC29	-	-	-	+
MC30	-	+	-	+
MC31	-	-	-	-
MC32	-	+	-	+
MC33	-	-	-	+
MC34	-	+	-	+

Continuação tabela S1.

Meio/Isolado	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 4083	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 1934	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> ATCC 355
MC35	-	+	-	-
MC36	-	-	-	-
MC37	-	-	-	+
MC38	-	+	-	+
<b>MC39</b>	+	+	-	+
MC40	-	+	-	-
MC41	-	-	-	+
MC42	-	+	-	-
MC43	-	-	-	-
MC44	-	+	-	+
MC45	-	+	-	-
MC46	-	+	-	+
MC47	-	+	-	+
MC48	-	+	-	+
MC49	-	-	-	+
MC50	-	+	-	+
MC51	-	+	-	+
MC52	-	+	-	+
<b>MC53</b>	+	+	-	+
MC54	-	-	-	-
MC55	-	-	-	-
MC56	-	+	-	+
MC57	-	-	-	+
MC58	+	-	-	+
MC59	+	-	-	+
MC60	-	-	-	-
MC61	-	-	-	-
MC62	-	+	-	+
MC63	-	-	-	-
MC64	-	-	-	-

Continuação tabela S1.

Meio/Isolado	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 4083	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 1934	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> ATCC 355
MC65	-	-	-	-
MC66	-	-	-	-
MC67	-	-	-	-
MC68	-	-	-	-
MC69	-	-	-	-
MC70	+	-	-	-
MC71	+	-	-	-
MC72	+	-	-	-
MC73	-	-	-	-
MC74	-	-	+	-
MC75	+	-	+	-
MC76	+	-	-	-
MC77	+	-	+	-
MC78	-	-	-	-
MC79	+	-	+	-
<b>MC80</b>	+	-	+	-
MC81	-	-	-	-
MC82	-	-	+	-
MC83	+	-	+	-
<b>MC84</b>	+	-	+	-
MC85	+	-	+	-
MC86	-	-	+	-
MC87	-	+	-	+
<b>MC88</b>	-	+	+	+
MC89	-	+	-	-
MC90	+	+	-	-
<b>MC91</b>	+	+	-	+
MC92	-	+	-	-
MC93	-	+	-	-
MC94	-	+	-	-

Continuação tabela S1.

Meio/Isolado	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 4083	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 1934	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> ATCC 355
MC95	-	+	+	-
<b>MC96</b>	-	+	+	+
<b>MC97</b>	-	+	+	+
<b>MC98</b>	+	+	+	+
MC99	-	+	+	-
MC100	-	+	+	+
<b>MC101</b>	+	+	+	+
MC102	-	+	+	-
<b>MC103</b>	-	+	+	-
<b>MC104</b>	+	+	+	-
MC105	-	+	+	-
<b>MC106</b>	+	+	+	+
<b>MC107</b>	+	+	+	+
<b>MC108</b>	+	+	+	+
MC109	+	-	-	-
<b>MC110</b>	+	+	+	-
MC111	+	+	-	-
<b>MC112</b>	+	+	-	-
MC113	-	+	-	-
<b>MC114</b>	+	+	-	-
<b>MC115</b>	+	+	+	+
MC116	+	+	-	-
MC117	-	+	-	-
MC118	-	+	-	+
MC119	-	+	-	-
MC120	-	+	+	-
<b>MC121</b>	+	+	+	-
<b>MC122</b>	-	+	+	+
<b>MC123</b>	+	+	+	+
<b>MC124</b>	+	+	+	+

**Continuação tabela S1.**

Meio/Isolado	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 4083	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 1934	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> ATCC 355
<b>MC125</b>	+	+	+	-
MC126	+	-	+	-
<b>MC127</b>	+	+	-	+
MC128	-	-	-	-
MC129	+	-	-	-
<b>MC130</b>	+	+	-	+
<b>MC131</b>	+	+	+	+
MC132	-	+	-	-
MC133	-	-	-	+
MC134	-	-	-	+
MC135	+	-	-	+
MC136	-	-	-	-
MC137	-	-	-	-
MC138	-	-	-	+
MC139	-	-	-	+
MC140	-	-	-	-
MC141	-	-	-	-
MC142	-	-	-	+
MC143	-	-	-	-

**Tabela S2.** Distribuição dos genes envolvidos no metabolismo de carboidratos categorizados pelos subsistemas SEED. A quantidade de genes presente em cada subsistemas foi gerada na anotação funcional pelo software RAST. O genomas de *S. lutetienses* (isolados 9, 11, 58, 59 e 80) foram sequenciados nesse estudo. *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ATCC 43143 (NC\_017576.1) , *S. pasteurianus* ATCC 43144 (AP012054.1) e *S. pyogenes* (NC\_002737) foram obtidos no banco de dados de sequências GenBank. Em destaque os subsistemas representados no gráfico 3.

<b>Carbohydrate metabolism</b>	strain 9	strain 11	strain 58	strain 59	strain 80	<i>S. pasteurianus</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. gallolyticus</i>
<b>Central carbohydrate metabolism</b>	<b>39</b>	<b>39</b>	<b>39</b>	<b>42</b>	<b>39</b>	<b>56</b>	<b>59</b>	<b>49</b>
Methylglyoxal Metabolism	1	1	1	1	1	1	2	1
Pyruvate metabolism II: acetyl-CoA, acetogenesis from pyruvate	3	3	3	3	3	3	5	3
Pyruvate Alanine Serine Interconversions	4	4	4	4	4	4	4	4
Dihydroxyacetone kinases	3	3	3	3	3	4	0	4
Glycolysis and Gluconeogenesis	11	11	11	11	11	11	13	11
Dehydrogenase complexes	4	4	4	4	4	4	4	4
Pentose phosphate pathway	5	5	5	8	5	9	8	10
Pyruvate metabolism I: anaplerotic reactions, PEP	7	7	7	7	7	9	14	7
Entner-Doudoroff Pathway	0	0	0	0	0	10	9	0
Glycolate, glyoxylate interconversions	1	1	1	1	1	1	0	1
TCA Cycle	0	0	0	0	0	0	0	4
<b>Aminosugars</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>16</b>	<b>7</b>	<b>4</b>

Continuação tabela S2.

Carbohydrate metabolism	strain 9	strain 11	strain 58	strain 59	strain 80	<i>S. pasteurianus</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. gallolyticus</i>
Chitin and N-acetylglucosamine utilization	2	2	2	3	2	8	2	4
N-Acetyl-Galactosamine and Galactosamine Utilization	0	0	0	0	0	8	5	0
<b>Di- and oligosaccharides</b>	<b>73</b>	<b>73</b>	<b>67</b>	<b>69</b>	<b>75</b>	<b>121</b>	<b>70</b>	<b>109</b>
Sucrose utilization	6	6	6	8	6	12	5	6
Fructooligosaccharides(FOS) and Raffinose Utilization	10	10	10	11	10	19	10	13
Maltose and Maltodextrin Utilization	16	16	16	16	17	18	16	24
Trehalose Uptake and Utilization	5	5	0	0	0	5	5	6
Beta-Glucoside Metabolism	19	19	19	19	26	39	16	33
Lactose and Galactose Uptake and Utilization	17	17	16	17	16	27	17	27
Lactose utilization	0	0	0	0	0	1	1	0
Glycoside hydrolases	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>One-carbon Metabolism</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
One-carbon metabolism by tetrahydropterines	5	5	5	5	5	5	5	5
Formaldehyde assimilation: Ribulose monophosphate pathway	0	0	0	0	0	0	0	1
<b>Organic acids</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>6</b>
Glycerate metabolism	2	2	2	2	2	2	2	4

Continuação tabela S2.

Carbohydrate metabolism	strain 9	strain 11	strain 58	strain 59	strain 80	<i>S. pasteurianus</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. gallolyticus</i>
Alpha-acetolactate operon	2	2	2	2	2	2	0	2
Citrate Metabolism, Transport, and Regulation	0	0	0	0	0	0	6	0
<b>Fermentation</b>	<b>25</b>	<b>25</b>	<b>25</b>	<b>27</b>	<b>25</b>	<b>29</b>	<b>34</b>	<b>28</b>
Fermentations: Mixed acid	9	9	9	9	9	12	13	11
Acetolactate synthase subunits	2	2	2	2	2	2	0	2
Fermentations: Lactate	5	5	5	7	5	6	5	6
Acetoin, butanediol metabolism	9	9	9	9	9	9	8	9
CO2 fixation	0	0	0	0	0	0	0	0
Butanol Biosynthesis	0	0	0	0	0	0	8	0
<b>Sugar alcohols</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>9</b>	<b>12</b>
Glycerol and Glycerol-3-phosphate Uptake and Utilization	0	0	0	0	0	5	9	5
Mannitol Utilization	0	0	0	0	0	0	0	7
<b>Carbohydrates - no subcategory</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
VC0266*	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Polysaccharides</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>12</b>
Glycogen metabolism	2	2	2	2	2	4	2	9

Continuação tabela S2.

Carbohydrate metabolism	strain 9	strain 11	strain 58	strain 59	strain 80	<i>S. pasteurianus</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. gallolyticus</i>
Alpha-Amylase locus in Streptococcus	3	3	3	3	3	1	1	1
<b>Monosaccharides</b>	<b>13</b>	<b>13</b>	<b>13</b>	<b>27</b>	<b>13</b>	<b>51</b>	<b>35</b>	<b>36</b>
Mannose Metabolism	4	4	4	4	4	9	7	5
D-ribose utilization	1	1	1	1	1	1	1	2
Deoxyribose and Deoxynucleoside Catabolism	8	8	8	8	8	9	9	8
L-ascorbate utilization (and related gene clusters)	0	0	0	8	0	8	8	8
Fructose utilization	0	0	0	6	0	14	10	13
D-Galacturonate and D-Glucuronate Utilization	0	0	0	0	0	10	0	0

\*Hypothetical protein VC0266 sugar utilization related

**Tabela S3.** Distribuição dos genes envolvidos metabolismo de nitrogênio categorizados pelos subsistemas SEED. A quantidade de genes presente em cada subsistemas foi gerada na anotação funcional pelo software RAST. O genomas de *S. lutetienses* (isolados 9, 11, 58, 59 e 80) foram sequenciados nesse estudo. *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ATCC 43143 (NC\_017576.1) , *S. pasteurianus* ATCC 43144 (AP012054.1) e *S. pyogenes* (NC\_002737) foram obtidos no banco de dados de sequências GenBank. Em destaque os subsistemas representados no gráfico 4.

Nitrogen metabolism	Strain 9	Strain 11	Strain 58	Strain 59	Strain 80	<i>S. pausterianus</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. gallolyticus</i>
<b>Glutamine, glutamate, aspartate, asparagine</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>7</b>	<b>15</b>
Glutamine, Glutamate, Aspartate and Asparagine Biosynthesis	13	13	13	13	13	13	6	13
Glutamate dehydrogenases	1	1	1	1	1	1	0	1
Glutamine synthetases	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Histidine Metabolism</b>	<b>12</b>	<b>12</b>	<b>12</b>	<b>12</b>	<b>12</b>	<b>11</b>	<b>6</b>	<b>12</b>
Histidine Biosynthesis	12	12	12	12	12	11	6	12
<b>Arginine; urea cycle, polyamines</b>	<b>46</b>	<b>46</b>	<b>46</b>	<b>46</b>	<b>46</b>	<b>30</b>	<b>29</b>	<b>42</b>
Arginine Deiminase Pathway	7	7	7	7	7	3	10	6
Polyamine Metabolism	8	8	8	8	8	7	9	9
Arginine and Ornithine Degradation	11	11	11	11	11	0	10	9
Arginine Biosynthesis extended	10	10	10	10	10	10	0	9
Arginine Biosynthesis -- gjo	10	10	10	10	10	10	0	9

Continuação tabela S3.

<b>Nitrogen metabolism</b>	Strain 9	Strain 11	Strain 58	Strain 59	Strain 80	<i>S. pausterianus</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. galloyticus</i>
<b>Lysine, threonine, methionine, and cysteine</b>	<b>65</b>	<b>65</b>	<b>65</b>	<b>65</b>	<b>65</b>	<b>64</b>	<b>23</b>	<b>78</b>
S-methylmethionine	1	1	1	1	1	0	0	2
Methionine Biosynthesis	25	25	25	25	25	23	13	30
Threonine degradation	1	1	1	1	1	1	0	1
Lysine Biosynthesis DAP Pathway, GJO scratch	8	8	8	8	8	9	0	9
Methionine Degradation	9	9	9	9	9	10	8	13
Threonine and Homoserine Biosynthesis	10	10	10	10	10	10	0	10
Cysteine Biosynthesis	3	3	3	3	3	2	2	4
Lysine Biosynthesis DAP Pathway	8	8	8	8	8	9	0	9
Amino Acids and Derivatives - no subcategory	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Branched-chain amino acids</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	<b>0</b>	<b>15</b>
Branched-Chain Amino Acid Biosynthesis	10	10	10	10	10	11	10	0
Leucine Biosynthesis	5	5	5	5	5	6	0	5
Polyamines	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Aromatic amino acids and derivatives</b>	<b>46</b>	<b>46</b>	<b>46</b>	<b>47</b>	<b>47</b>	<b>32</b>	<b>22</b>	<b>50</b>

Continuação tabela S3.

<b>Nitrogen metabolism</b>	Strain 9	Strain 11	Strain 58	Strain 59	Strain 80	<i>S. pausterianus</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. galloyticus</i>
Common Pathway For Synthesis of Aromatic Compounds (DAHP synthase to chorismate)	8	8	8	8	8	8	8	8
Chorismate Synthesis	11	11	11	11	11	11	9	11
Chorismate: Intermediate for synthesis of Tryptophan, PAPA antibiotics, PABA, 3-hydroxyanthranilate and more.	12	12	12	13	13	9	4	15
Phenylalanine and Tyrosine Branches from Chorismate	4	4	4	4	4	4	1	4
Tryptophan synthesis	11	11	11	11	11	0	0	12
<b>Proline and 4-hydroxyproline</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
Proline Synthesis	4	4	4	4	4	4	3	4
A Hypothetical Protein Related to Proline Metabolism	2	2	2	2	2	2	2	2
<b>Alanine, serine, and glycine</b>	<b>21</b>	<b>21</b>	<b>21</b>	<b>21</b>	<b>21</b>	<b>19</b>	<b>12</b>	<b>24</b>
Glycine Biosynthesis	1	1	1	1	1	1	1	1
Alanine biosynthesis	5	5	5	5	5	5	5	6
Serine Biosynthesis	6	6	6	6	6	5	1	6
Glycine and Serine Utilization	9	9	9	9	9	8	5	11
<b>Nitrogen Metabolism - no subcategory</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>5</b>

**Continuação tabela S3.**

<b>Nitrogen metabolism</b>	Strain 9	Strain 11	Strain 58	Strain 59	Strain 80	<i>S. pausterianus</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. gallolyticus</i>
Ammonia assimilation	6	6	6	6	6	5	0	5
Denitrification	0	0	0	0	0	0	0	0

**Tabela S4.** Distribuição dos genes envolvidos na biossíntese de vitaminas categorizados pelos subsistemas SEED. A quantidade de genes presente em cada subsistemas foi gerada na anotação funcional pelo software RAST. O genomas de *S. lutetienses* (isolados 9, 11, 58, 59 e 80) foram sequenciados nesse estudo. *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ATCC 43143 (NC\_017576.1) , *S. pasteurianus* ATCC 43144 (AP012054.1) e *S. pyogenes* (NC\_002737) foram obtidos no banco de dados de sequências GenBank. Em destaque os subsistemas representados no gráfico 5.

<b>Vitamin biosynthesis</b>	Strain 9	Strain 11	Strain 58	Strain 59	Strain 80	<i>S. pasteurianus</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. gallolyticus</i>
<b>Biotin</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>11</b>	<b>9</b>	<b>13</b>
Biotin biosynthesis	2	2	2	2	2	9	8	10
Biotin biosynthesis Experimental	0	0	0	0	0	2	1	3
<b>Thiamin biosynthesis</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>7</b>	<b>9</b>	<b>4</b>	<b>8</b>
<b>Quinone cofactors</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
Tetrapyrroles	0	0	0	0	0	0	0	0
Menaquinone and Phylloquinone Biosynthesis	0	0	0	0	0	0	1	0
<b>Riboflavin, FMN, FAD</b>	<b>36</b>	<b>36</b>	<b>36</b>	<b>34</b>	<b>36</b>	<b>18</b>	<b>6</b>	<b>36</b>
Riboflavin, FMN and FAD metabolism in plants	14	14	14	15	14	0	0	16
riboflavin to FAD	4	4	4	4	4	4	2	4
Flavodoxin	8	8	8	5	8	4	1	6
Riboflavin, FMN and FAD metabolism	10	10	10	10	10	10	3	10
Fe-S clusters	0	0	0	0	0	0	0	0

Continuação tabela S4.

Vitamin biosynthesis	Strain 9	Strain 11	Strain 58	Strain 59	Strain 80	<i>S. pasteurianus</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. galloyticus</i>
Mycofactocin	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Pyridoxine</b>	<b>13</b>	<b>13</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>12</b>	<b>9</b>	<b>5</b>	<b>15</b>
Pyridoxin (Vitamin B6) Biosynthesis	12	12	11	12	11	8	4	14
Pyridoxin(Vitamin B6) Degradation Pathway	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>NAD and NADP</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>15</b>	<b>15</b>
NAD and NADP cofactor biosynthesis global	15	15	15	15	15	16	15	15
Coenzyme B	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Folate and pterines</b>	<b>38</b>	<b>38</b>	<b>38</b>	<b>40</b>	<b>38</b>	<b>41</b>	<b>22</b>	<b>41</b>
Folate biosynthesis cluster	9	9	9	9	9	8	8	9
Folate Biosynthesis	16	16	16	16	16	18	14	17
5-FCL-like protein	13	13	13	15	13	15	0	15
<b>Lipoic acid</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>1</b>
Lipoic acid metabolism	1	1	1	1	1	1	3	1
Coenzyme F420	0	0	0	0	0	0	0	0
Coenzyme M	0	0	0	0	0	0	0	0

Continuação tabela S4.

Vitamin biosynthesis	Strain 9	Strain 11	Strain 58	Strain 59	Strain 80	<i>S. pasteurianus</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. gallolyticus</i>
Coenzyme A	14	14	14	14	14	9	7	14
Coenzyme A Biosynthesis cluster	3	3	3	3	3	0	0	3
Coenzyme A Biosynthesis	11	11	11	11	11	9	7	11

**Tabela S5 (A).** Subsistema funcional SEED reportando o número de genes envolvidos no possíveis fatores de patogenicidade. (A)\* Características específicas relacionadas ao número de genes envolvidos em virulência, defesa e invasão celular, (B)\* genes envolvidos em síntese de parede celular e capsula. A quantidade de genes presente em cada subsistemas foi gerada na anotação funcional pelo software RAST. O genomas de *S. lutetienses* (isolados 9, 11, 58, 59 e 80) foram sequenciados nesse estudo. *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ATCC 43143 (NC\_017576.1) , *S. pasteurianus* ATCC 43144 (AP012054.1) e *S. pyogenes* (NC\_002737) foram obtidos no GenBank. Em destaque os subsistemas representados no gráfico 6 (A).

Virulence	Strain 9	Strain 11	Strain 58	Strain 59	Strain 80	<i>S. pasteurianus</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. gallolyticus</i>
<b>Adhesion</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>1</b>
Streptococcus pyogenes recombinatorial zone	1	1	1	1	1	1	5	1
<b>Toxins and superantigens</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>9</b>	<b>0</b>
Streptolysin S Biosynthesis and Transport	0	0	0	0	0	0	9	0
<b>Resistance to antibiotics and toxic compounds</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>15</b>	<b>30</b>	<b>17</b>	<b>31</b>
Copper homeostasis	4	4	4	4	4	5	4	5
Bile hydrolysis	1	1	1	1	1	1	0	1
Cobalt-zinc-cadmium resistance	3	3	3	3	3	4	4	6
Streptococcus pneumoniae Vancomycin Tolerance Locus	2	2	2	2	2	7	0	2

Continuação tabela S5A.

Virulence	Strain 9	Strain 11	Strain 58	Strain 59	Strain 80	<i>S. pasteurianus</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. gallolyticus</i>
Resistance to fluoroquinolones	4	4	4	4	4	4	4	4
Multidrug Resistance Efflux Pumps	1	1	1	2	1	1	1	3
Copper homeostasis: copper tolerance	0	0	0	0	0	2	2	3
Tetracycline resistance, ribosome protection type, too	0	0	0	0	0	3	0	2
Tetracycline resistance, ribosome protection type	0	0	0	0	0	3	0	2
Mercury resistance operon	0	0	0	0	0	0	0	1
Mercuric reductase	0	0	0	0	0	0	0	2
Cadmium resistance	0	0	0	0	0	0	2	0
<b>Virulence, Disease and Defense - no subcategory</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>31</b>	<b>0</b>
Detection	0	0	0	0	0	0	0	0
Streptococcus pyogenes Virulome	0	0	0	0	0	0	31	0
<b>Invasion and intracellular resistance</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	<b>15</b>
Mycobacterium virulence operon involved in	4	4	4	4	4	4	4	4

---

protein synthesis (SSU ribosomal proteins)									
Mycobacterium virulence operon involved in an unknown function with a Jag Protein and YidC and YidD	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Mycobacterium virulence operon involved in DNA transcription	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Mycobacterium virulence operon possibly involved in quinolinate biosynthesis	3	3	3	3	3	3	0	3	3
Mycobacterium virulence operon involved in protein synthesis (LSU ribosomal proteins)	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Gram-Positive Extracellular Nucleases	0	0	0	0	0	0	4	0	0
Listeria surface proteins: Internalin-like proteins	0	0	0	0	0	0	1	0	0

---

**Tabela S5 (B).** Subsistema funcional SEED reportando o número de genes envolvidos nos possíveis fatores de patogenicidade. (B) genes envolvidos em síntese de parede celular e capsula. A quantidade de genes presente em cada subsistema foi gerada na anotação funcional pelo software RAST. A quantidade de genes presente em cada subsistema foi gerada na anotação funcional pelo software RAST. O genomas de *S. lutetienses* (isolados 9, 11, 58, 59 e 80) foram sequenciados nesse estudo. *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ATCC 43143 (NC\_017576.1) , *S. pasteurianus* ATCC 43144 (AP012054.1) e *S. pyogenes* (NC\_002737) foram obtidos no GenBank. Em destaque os subsistemas representados no gráfico 6 (B).

Cell wall	Strain 11	Strain 58	Strain 59	Strain 80	<i>S. pasteurianus</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. gallolyticus</i>
<b>Capsular and extracellular polysacchrides</b>	<b>53</b>	<b>56</b>	<b>54</b>	<b>58</b>	<b>42</b>	<b>37</b>	<b>39</b>
dTDP-rhamnose synthesis	5	5	4	5	4	4	4
Streptococcal group antigen operons	17	18	16	18	0	0	0
Rhamnose containing glycans	13	14	12	12	11	9	12
Extracellular Polysaccharide Biosynthesis of Streptococci	4	4	6	7	4	0	7
Exopolysaccharide Biosynthesis	4	5	5	6	4	0	5
Sialic Acid Metabolism	10	10	11	10	19	18	11
Gram-Negative cell wall components	0	0	0	0	0	0	0
Polysaccharide deacetylases	0	0	0	0	0	2	0
Streptococcal Hyaluronic Acid Capsule	0	0	0	0	0	4	0
<b>Cell Wall and Capsule</b>	<b>45</b>	<b>46</b>	<b>47</b>	<b>45</b>	<b>41</b>	<b>44</b>	<b>51</b>
<b>Continuação tabela S5B</b>							

Cell wall	Strain 11	Strain 58	Strain 59	Strain 80	<i>S. pausterianus</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. gallolyticus</i>
Murein Hydrolases	6	7	7	6	4	5	9
Peptidoglycan Biosynthesis	21	21	21	21	20	21	22
UDP-N-acetylmuramate from Fructose-6-phosphate Biosynthesis	7	7	7	7	7	7	7
YjeE	3	3	3	3	3	2	3
Recycling of Peptidoglycan Amino Acids	3	3	4	3	2	1	5
Peptidoglycan biosynthesis--gjo	5	5	5	5	5	5	5
tRNA-dependent amino acid transfers	0	0	0	0	0	3	0
<b>Gram-Positive cell wall components</b>	<b>26</b>	<b>26</b>	<b>27</b>	<b>26</b>	<b>20</b>	<b>18</b>	<b>25</b>
Teichoic and lipoteichoic acids biosynthesis	10	10	10	10	7	7	7
D-Alanyl Lipoteichoic Acid Biosynthesis	4	4	4	4	4	4	4
Sortase	8	8	9	8	4	3	10
Polyglycerolphosphate lipoteichoic acid biosynthesis	4	4	4	4	4	4	4
Teichuronic acid biosynthesis	0	0	0	0	1	0	0
Cell wall of Mycobacteria	0	0	0	0	0	0	0

**Tabela S6:** Análise do sequenciamento RNA 16S, parâmetros Blast

Sequência ID (GenBank)	Tamanho	Cobertura (%)	E-value (*)	% ID
Isolado 6, melhor <i>score</i>				
<i>Streptococcus lutetiensis</i> strain CIP 106849	650	99	0.0	99
Isolado 9, melhor <i>score</i>				
<i>Streptococcus lutetiensis</i> strain CIP 106849	640	99	0.0	99
Isolado 11, melhor <i>score</i>				
<i>Streptococcus lutetiensis</i> strain HDP9024	638	100	0.0	99
Isolado 36, melhor <i>score</i>				
<i>Streptococcus lutetiensis</i> strain CIP 106849	626	100	0.0	99
Isolado 51, melhor <i>score</i>				
<i>Streptococcus equinus</i> strain NBRC 12553	570	100	0.0	99
Isolado 53, melhor <i>score</i>				
<i>Streptococcus lutetiensis</i> strain CIP 106849	630	100	0.0	99
Isolado 54, melhores <i>scores</i>				
<i>Streptococcus lutetiensis</i> strain CIP 106849	621	100	0.0	99
Isolado 55, melhor <i>score</i>				
<i>Streptococcus lutetiensis</i> strain CIP 106849	650	100	0.0	99
Isolado 58, melhor <i>score</i>				
<i>Streptococcus lutetiensis</i> strain HDP90246	630	100	0.0	99
Isolado 59, melhor <i>score</i>				
<i>Streptococcus lutetiensis</i> strain CIP 106849	561	100	0.0	98
Isolado 60, melhor <i>score</i>				
<i>Streptococcus lutetiensis</i> strain CIP 106849	580	100	0.0	99
Isolado 63, melhor <i>score</i>				
<i>Streptococcus lutetiensis</i> strain CIP 106849	636	100	0.0	99
Isolado 80, melhor <i>score</i>				
<i>Streptococcus lutetiensis</i> strain CIP 106849	563	100	0.0	99

**Tabela S7:** Tabela representando a validação dos *clusters* de bacteriocina identificados nos genomas de *S. lutetiensis* pelo software Antismash (Capítulo 2/Figura 3). As análises foram realizadas utilizando o algoritmo BLAST e 70% de identidade entre as proteínas de cada *cluster*. Nos genomas de *S. lutetiensis* (isolados 9, 11, 58 e 80), *cluster* 1 e no genoma de *S. lutetiensis* 59 (*cluster* 3) foram encontrados *clusters* gênicos putativos associados com a biossíntese de bacteriocinas da classe II (Tabela S7 A/B). O genoma do isolado 59 também apresentou um segundo *cluster* gênico (*cluster* 4) relacionado com a biossíntese de antibióticos. P(proteína)\_isolado\_C(cluster).

#### A. Bacteriocinas da classe II.

<i>S. lutetiensis</i> _9_Cluster 1	P 1_9_C1	P 2_9_C1	P 3_9_C1	P 4_9_C1	P 5_9_C1	P 6_9_C1	P 7_9_C1	P 8_9_C1	P 9_9_C1	P 10_9_C1	P 11_9_C1	P 12_9_C1	P 13_9_C1	P 14_9_C1	P 15_9_C1
<i>S. lutetiensis</i> _11_Cluster 1	P 1_11_C1	P 2_11_C1	P 3_11_C1	P 4_11_C1	P 5_11_C1	P 6_11_C1	P 7_11_C1	P 8_11_C1	P 9_11_C1	P 10_11_C1	P 11_11_C1	P 12_11_C1	P 13_11_C1	P 14_11_C1	P 15_11_C1
<i>S. lutetiensis</i> _58_Cluster 1	P 1_58_C1	P 2_58_C1		P 4_58_C1	P 5_58_C1	P 6_58_C1	P 7_58_C1	P 8_58_C1	P 9_58_C1	P 10_58_C1	P 11_58_C1	P 12_58_C1	P 13_58_C1	P 14_58_C1	P 15_58_C1
<i>S. lutetiensis</i> _59_Cluster 3						P 6_59_C3	P 7_59_C3	P 8_59_C3	P 9_59_C3	P 10_59_C3	P 11_59_C3			P 14_59_C3	
<i>S. lutetiensis</i> _80_Cluster 1		P 2_80_C1	P 3_80_C1	P 4_80_C1		P 6_80_C1	P 7_80_C1			P 10_80_C1	P 11_80_C1			P 14_80_C1	

#### B. Bacteriocinas da classe II.

<i>S. lutetiensis</i> _80_Cluster 2	P 1_80_C2	P 2_80_C2	P 3_80_C2	P 4_80_C2	P 5_80_C2	P 6_80_C2	P 7_80_C2	P 8_80_C2	P 9_80_C2	P 10_80_C2	P 11_80_C2	P 12_80_C2	P 13_80_C2	P 14_80_C2	P 15_80_C2	P 16_80_C2	P 17_80_C2
<i>S. lutetiensis</i> _9_Cluster 1							P 7_9_C1			P 10_9_C1	P 11_9_C1	P 12_9_C1	P 13_9_C1	P 14_9_C1			
<i>S. lutetiensis</i> _11_Cluster 1							P 7_11_C1			P 10_11_C1	P 11_11_C1	P 12_11_C1	P 13_11_C1	P 14_11_C1			
<i>S. lutetiensis</i> _58_Cluster 1							P 7_58_C1			P 10_58_C1	P 11_58_C1	P 12_58_C1	P 13_58_C1	P 14_58_C1			
<i>S. lutetiensis</i> _59_Cluster 3							P 7_59_C3			P 10_59_C3	P 11_59_C3			P 14_59_C3			

#### C. Biossíntese de antibióticos

<i>S. lutetiensis</i> _59_Cluster 4	P 1_59_C4	P 2_59_C4	P 3_59_C4	P 4_59_C4	P 5_59_C4	P 6_59_C4	P 7_59_C4	P 8_59_C4	P 9_59_C4	P 10_59_C4	P 11_59_C4	P 12_59_C4	P 13_59_C4
<i>S. lutetiensis</i> _9_Cluster 1							P 7_9_C1			P 10_9_C1	P 11_9_C1		
<i>S. lutetiensis</i> _11_Cluster 1							P 7_11_C1			P 10_11_C1	P 11_11_C1		
<i>S. lutetiensis</i> _58_Cluster 1							P 7_58_C1			P 10_58_C1	P 11_58_C1		
<i>S. lutetiensis</i> _80_Cluster 2							P 7_80_C1			P 10_80_C1	P 11_80_C1		