



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL E
BIOPROCESSOS



**Bioprospecção de substâncias antimicrobianas em
bactérias oriundas de peixes e água por meio de
análises *in vitro* e ômicas**

Sheila da Silva

**Rio de Janeiro
2023**

Sheila da Silva



**Bioprospecção de substâncias antimicrobianas em
bactérias oriundas de peixes e água por meio de
análises *in vitro* e ômicas**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos.

Orientadores: Dr. Andrew Macrae
Dra. Selma Soares de Oliveira

Rio de Janeiro
2023

CIP - Catalogação na Publicação

d586b da Silva, Sheila
Bioprospecção de substâncias antimicrobianas em bactérias oriundas de peixes e água por meio de análises in vitro e ômicas / Sheila da Silva. -- Rio de Janeiro, 2023.
278 f.

Orientador: Andrew Macrae.
Coorientadora: Selma Soares de Oliveira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Decania do Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, 2023.

1. Substâncias antimicrobianas. 2. Bacteriocinas. 3. Genômica. 4. Metagenômica. 5. Peixes. I. Macrae, Andrew, orient. II. Soares de Oliveira, Selma, coorient. III. Título.



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde

Coordenação de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal
e Bioprocessos

ATA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE SHEILA DA SILVA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS (BIOTECNOLOGIA VEGETAL E BIOPROCESSOS).

Aos trinta e um dias do mês de julho de dois mil e vinte e três, às 10 horas, reuniu-se via videoconferência, a Banca Examinadora abaixo discriminada para avaliação da Tese de Doutorado da aluna **Sheila da Silva** intitulada “Bioprospecção de substâncias antimicrobianas em bactérias oriundas de peixes e água por meio de análises *in vitro* e ômicas”, desenvolvida sob a orientação do **Prof. Andrew Macrae** e da **Dr^a. Selma Soares de Oliveira**. A apresentação feita pela candidata foi acompanhada da arguição pelos componentes da Banca. Em seguida, esta se reuniu para sua avaliação e a defesa foi considerada (**A**) (inserir letra apropriada).

- A) Aprovado;
- B) Aprovado com pequenas modificações* a serem combinadas com o Presidente da Banca dentro de um mês;
- C) Não aprovado ainda, é necessária a apresentação das modificações/correções* em uma nova versão do documento para o Presidente da Banca e uma carta do Presidente com prazo de máximo 3 meses para ser aprovada; se não reprovada
- D) Não aprovado ainda, é necessária uma nova apresentação*, oral e escrita, para a mesma ou nova banca examinadora dentro de um prazo combinado com a comissão do Programa.
- E) Reprovado, razões da reprovação* escritas no espaço destinado.

*As modificações/correções/razões para reprovação precisam ser discriminadas e o Presidente da Banca e o(a) aluno(a) precisam estar cientes.

E, para constar, foi lavrada a presente ata que vai devidamente assinada pelo coordenador, pelos membros da Banca Examinadora, pelo Presidente da Banca Examinadora e pelos orientadores da aluna, que ficará com uma via da ata e entregará outra para a secretaria do PBV.

Rio de Janeiro, 31 de julho de 2023.



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde

Coordenação de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal
e Bioprocessos

ATA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE SHEILA DA SILVA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS (BIOTECNOLOGIA VEGETAL E BIOPROCESSOS).

Dr^a. Fernanda Reinert Thomé Macrae – Coordenadora

Dr^a. Fernanda de Ávila Abreu - UFRJ

Dr. Luis William Pacheco Arge - UFRJ

Dr^a. Ana Maria Mazotto de Almeida - UFRJ

Dr^a. Ângela Correa de Freitas Almeida – UERJ

Dr. Mateus MatiuZZi da Costa - UNIVASF

Dr. Andrew Macrae (Orientador)

Dr^a. Selma Soares de Oliveira (Orientadora)

Sheila da Silva (Doutoranda)

LISTA DE MODIFICAÇÕES, CORREÇÕES OU RAZÕES PARA REPROVAÇÕES:

Ciente,

Presidente da Banca

Ciente,

Aluno

“Senhor, Fazei de mim um instrumento de vossa paz!

Onde houver ódio, que eu leve o amor.

Onde houver ofensa, que eu leve o perdão.

Onde houver discórdia, que eu leve a união.

Onde houver dúvida, que eu leve a fé.

Onde houver o erro, que eu leve a verdade.

Onde houver desespero, que eu leve a esperança.

Onde houver tristeza, que eu leve a alegria.

Onde houver trevas, que eu leve a luz!

Ó Mestre, fazei que eu procure mais. Consolar, que ser consolado.

Compreender, que ser compreendido.

Amar, que ser amado. Pois é dando, que se recebe.

Perdoando, que se é perdoado e é morrendo, que se vive para a vida eterna!”

(Oração de São Francisco de Assis)

Aos meus pais que sempre acreditaram
em mim, até mesmo quando eu não acreditava,
e em memória à minha vizinha Gilda que faz tanta falta.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por todas as oportunidades de aprendizado e evolução nesta encarnação.

Agradecer a todos os familiares e amigos que sempre me apoiaram nos momentos difíceis, como também compartilharam momentos de alegrias. À minha irmã **Shirley da Silva** e aos meus Pais, **Rosane da Silva** e **Ivan da Silva**, por estarem sempre ao meu lado, me dando todo o apoio necessário em minha vida. Juntos somos um só.

Ao meu filho de quatro patas, **Banguela**, que me mostrou como o mundo pode ser belo, colorido, sem frescuras e com muito amor.

Aos amigos de laboratório que me ajudaram nessa longa jornada, desde a iniciação científica até a minha defesa de doutorado. Foram longos e prazerosos anos de muito aprendizado. Ao técnico e amigo **Renato** que muito nos ajudou e acolheu durante todo esse tempo, com sua alegria e carinhos com todos; ao Dr. **José Roberto** [nosso Zé] que nos salvou muitas vezes com sua sabedoria e conhecimento; um agradecimento mais que especial à **Barbara Alvarenga Peckle** e ao **João Ricardo Vidal Amaral**. À **Barbara** por ser uma grande amiga que a UFRJ me proporcionou, que aturou todos os meus desesperos durante esse período difícil de doutorado × pandemia, sempre ajudando com todas as conversas e ideias. Como também topando todos os desafios de organização de eventos, novos projetos, saídas de campo para fazer análises, fora as caronas que sempre me ajudaram muito. Ao **João Ricardo**, que com sua timidez e inteligência conquistou todos e se tornou um grande amigo e também um companheiro de bioinformática. Sempre pronto para ajudar a revisar os artigos e análises. Seu apoio foi fundamental nesses últimos meses de doutorado, sempre me ajudando nos momentos mais difíceis, como também auxiliando nas análises finais dos metagenomas, meu muito obrigada; À **Sarah Mederos**, que me fez dar boas risadas em diversos momentos com suas histórias inacreditáveis, sempre alegrando o ambiente.

A todos os alunos de iniciação científica, que me proporcionaram a oportunidade de ensinar e aprender e também dar grandes risadas, com as nossas comemorações. Principalmente aos alunos ativos em 2022, que mostraram a esperança de retornar à pesquisa, depois de tempos tão sombrios devido à pandemia. Sempre vou me lembrar dos nossos almoços, conversas e arrumações! Aos alunos **Felipe Diniz**, **Alex Pessoa**, **Luan**

Almeida, Vicente Almeida, Bianca Melo, Mayara Santos, Jessyca Olimpio, Fabricia, Laura e muitos outros que passaram durante os anos.

Muito obrigada aos alunos **Gabryel Bernardo e Jonathas Moreno** da Universidade Federal do Vale do São Francisco, os quais pude orientá-los nesse último período, acrescentando conhecimentos e alegria em minha vida.

Meus agradecimentos especiais a todos os professores que pude conhecer e que muito me ensinaram durante esta trajetória de doutorado. À Dra. **Ângela C. de Freitas Almeida** pela parceria e colaboração com a coleção de cultura do gênero *Aeromonas*; Ao Dr. **Andrew S. Whiteley** que fez a coleta das amostras de peixes e de água, junto com o professor Dr. Andrew Macrae. À Dra. **Ana Maria Mazotto de Almeida**, Dra. **Fernanda de Ávila Abreu** e ao Dr. **Luis Willian Pacheco Arge**, por estarem sempre disponíveis e fazerem excelentes contribuições nas bancas ao longo do doutorado. Ao Dr. **Matheus Matiuzzi da Costa** pela parceria com os alunos, através das análises de bioinformática e artigos; Ao professor Dr. **Rommel Thiago Jucá Ramos** que tanto contribuiu para o meu aprendizado nas análises de metagenômica. Aproveito para agradecer a parceria com todos os colaboradores da **Rede de Ciências Ômicas (RECOM)** que é um projeto multidisciplinar voltado para análises de bioinformática, o qual nasceu em um momento de muita dificuldade durante a pandemia, para ajudar a exercer a ciência e auxiliar os alunos em suas análises.

Agradeço imensamente aos meus orientadores, Dra. **Selma Soares de Oliveira** pela oportunidade de fazer a iniciação científica e me ajudar a trilhar o caminho da ciência, abrindo portas para poder chegar ao final do meu doutorado. Ao Dr. **Andrew Macrae** que com toda sua espontaneidade, me ajudou a passar por todas as etapas do mestrado e doutorado. Aos dois agradeço imensamente pela grande oportunidade de ser orientada por vocês.

Agradeço em especial a **Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)** pela chance de expandir meus conhecimentos e crescer profissionalmente e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** que foi o órgão de fomento que financiou a bolsa e taxa de bancada, proporcionando assim, a realização da minha tese/pesquisa. Ao programa de mentoria e bolsa da **Dimension Science (DS-BRIDGE)** que me deu suporte em um momento tão importante e em que eu mais precisei. Agradeço também a todos os pesquisadores, médicos, enfermeiros e profissionais da saúde que lutaram para salvar vidas nessa difícil e triste pandemia (Covid-19) que ainda estamos enfrentando.

RESUMO

Silva, Sheila. Bioprospecção de substâncias antimicrobianas em bactérias oriundas de peixes e água por meio de análises *in vitro* e ômicas. Rio de Janeiro, 2023. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos) - Decania do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

A busca por substâncias antimicrobianas que sejam capazes de inibir o crescimento ou matar microrganismos patogênicos é um fator importante atualmente, tanto para a indústria farmacêutica, na fabricação de novos antibióticos, quanto para a indústria alimentícia, produzindo novos conservantes naturais. Substâncias antimicrobianas são agentes químicos produzidos naturalmente por diferentes organismos para sua própria defesa e possuem diferentes espectros e mecanismos de ação. Existem inúmeras substâncias antimicrobianas, como enzimas, antibióticos e peptídeos antimicrobianos, que incluem as bacteriocinas, substâncias produzidas por bactérias. Há relatos de que bactérias de ambientes aquáticos são candidatas promissoras para a produção dessas substâncias, por exemplo, o gênero *Aeromonas*, que é composto por bactérias com o formato cocobacilos e Gram-negativos, anaeróbios facultativos. O gênero *Acinetobacter* também foi descrito como produtor de bacteriocinas. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de produção de substâncias antimicrobianas em bactérias de ambientes aquáticos e comparar os resultados *in vitro* e *in silico*. Este estudo foi dividido em três etapas: A primeira foi avaliar o genoma de uma estirpe oriunda do peixe *Mugil brasiliensis* (nome popular: Tainha), com alta atividade antimicrobiana, classificada taxonomicamente pela técnica de *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) como *Aeromonas allosaccharophila* AE59-TE2, que é antagonista a: *Klebsiella pneumoniae* KPC, *Escherichia coli* ESBL, *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*. O genoma foi sequenciado com a plataforma MiSeq e resultou em 4.498.261 pb e 4.067 sequências codificantes. A mineração genômica revelou sequências homólogas à bacteriocina zoocina A de *Streptococcus equi* com 50% de identidade e 98% de identidade com o gene *cvpA* que codifica uma proteína envolvida na produção de colicina V. A segunda etapa do projeto foi a análise de uma cultura mista oriunda do peixe *Caranx latus* (nome popular: Xerelete), denominada 38-XC4, que inclui os genomas de *Aeromonas salmonicida* AE38-XC4 e *Acinetobacter pittii* ACP38-XC4 e possui atividade contra bactérias dos gêneros *Klebsiella pneumoniae* ESBL e *Staphylococcus*

aureus. O sequenciamento foi realizado com a plataforma Illumina MiSeq e para separar e montar os genomas, a técnica *Metagenome Assembled Genome* (MAG) foi utilizada com a ferramenta MetaBAT2, resultando 4.560.861 pb e 4.128 sequências codificantes para a estirpe *Aeromonas salmonicida* AE38.XC4, com 99,73% de integridade e 0,14% de contaminação. Quanto à estirpe *Acinetobacter pittii* ACP38.XC4, o tamanho do genoma foi de 3.823.853 pb e 3.637 sequências codificantes (CDSs) com 100% de integridade e 0,00 de contaminação. A ferramenta AntiSMASH identificou inúmeros *clusters*, incluindo: Sideróforos, NRPS, RiPPs e bacteriocinas. A análise de BLASTP revelou duas sequências para MAG1- *Acinetobacter pittii* ACP38-XC4 com 35,65% e 35,71% de identidade com a proteína produtora de zoocina A e três sequências com 35,96%, 43% e 45,65% de identidade com a proteína produtora de zoocina A para MAG2 – *Aeromonas salmonicida* AE38-XC4. A terceira etapa do projeto teve como objetivo coletar e isolar bactérias presentes em peixes da espécie *Serrasalmus rhombeus* coletados no rio São Benedito, Pará (Brasil) e detectar a produção de substâncias antimicrobianas nessas bactérias isoladas. Foram analisados 5 metagenomas da região ânus dos peixes e 4 metagenomas de água do Rio São Benedito, sendo assim a composição dos microbiomas e a anotação funcional foram relatadas. Sendo assim, *in vitro* foram isoladas 71 bactérias do peixe da espécie *Serrasalmus rhombeus*, das quais 45 apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas. A identificação preliminar por espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz por tempo de voo (MALDI-TOF) permitiu a identificação de 48 bactérias. Para os metagenomas de peixes, os gêneros mais comuns foram: *Kocuria*, *Staphylococcus* e *Bacillus*, com exceção para a amostra 1C3, que apresentou maior abundância das bactérias *Enterococcus* e *Macroccoccus*. Para as amostras de água, os filos mais comuns foram: *Actinobacteria* e *Proteobacteria*, para as quais a maior abundância identificada foi para o gênero *Mycobacterium*. Foram anotadas 14 sequências para os metagenomas oriundos da região ânus dos peixes e três sequências para os metagenomas oriundas da água do Rio São Benedito que são relacionadas com a produção de bacteriocinas: zoocina A, linocina, closticina e lactococina 972. Através desta tese, foi possível verificar que bactérias oriundas de ambiente aquático são promissoras na produção de substâncias antimicrobianas, sendo um excelente ambiente para realizar a bioprospecção.

Palavras-chave: *Aeromonas*; *Acinetobacter*; Bacteriocinas; *Metagenome Assembled Genome* (MAG); Peixe; *Mugil brasiliensis* (Tainha); *Caranx latus* (Xerelete); *Serrasalmus rhombeus* (piranha preta); Rio São Benedito; Zoocina A; Linocina; Closticina; Lactococina.

ABSTRACT

Silva, Sheila. Bioprospection of antimicrobial substances in bacteria from fish and water with *in vitro* and omics analyses. Rio de Janeiro, 2023. Thesis (Doctorate in Plant Biotechnology and Bioprocesses) – Decania do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

The search for antimicrobial substances that are capable of inhibiting the growth or killing pathogenic microorganisms is an important factor nowadays, both for the pharmaceutical industry, in the manufacture of new antibiotics, as well as in the food industry, producing new natural preservatives. Antimicrobial substances are chemical agents naturally produced by different organisms for their own defense and have different spectra and mechanisms of action. There are numerous antimicrobial substances such as enzymes, antibiotics, and antimicrobial peptides, which include bacteriocins, these are substances produced by bacteria. There are reports that bacteria from aquatic environments are promising candidates for the production of these substances. Like, for example, the genus *Aeromonas*, which are gram-negative coccobacilli, facultative anaerobes. The genus *Acinetobacter* has also been described as a producer of several substances with relevant activities, such as bacteriocins. Therefore, the objective of this study was to evaluate the potential for the production of antimicrobial substances in bacteria from aquatic environments and compare the results *in vitro* and *in silico* using bioinformatics. This study was divided into three steps: The first was to evaluate the genome of a strain, from the fish *Mugil brasiliensis* (popular name: Mullet/Tainha), with high antimicrobial activity, classified taxonomically by the Multilocus Sequence Analysis (MLSA) technique as *Aeromonas allosaccharophila* AE59-TE2, which was antagonistic towards: *Klebsiella pneumoniae* KPC, *Escherichia coli* ESBL, *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. The genome was sequenced with the MiSeq platform resulted in 4,498,261 bp and 4.067 coding sequences (CDSs). Genomic mining using BLAST revealed sequences homologous to bacteriocin zoocin A from *Streptococcus equi* with 50% identity and also found a gene with 98% identity to the *cvpA* gene that encodes a protein that is involved in the production of colicin V. The second stage of the project was the analysis of a mixed culture, from the fish *Caranx latus* (popular name: Xerelete), named 38-XC4, which includes the genomes of *Aeromonas salmonicida* AE38-XC4 and *Acinetobacter pittii* ACP38-XC4 and shows antimicrobial activity against bacteria of the

genera *Klebsiella pneumoniae* ESBL and *Staphylococcus aureus*. The platform Illumina MiSeq was used for sequencing and the Metagenome Assembled Genome (MAG) technique was used to separate and assemble the genomes of both strains, with MetaBAT2 tool, resulting in 4,560,861 bp and 4,128 coding sequences (CDSs) for strain *Aeromonas salmonicida* AE38.XC4 with 99.73% genome completeness and 0.14% contamination. As for the strain *Acinetobacter pittii* ACP38.XC4, the genome size was 3,823,853 bp and 3,637 coding sequences (CDSs) were predicted; 100% completeness and 0.00 contamination. Through bioinformatic analyses, the AntiSMASH tool identified several important clusters, including: Siderophores, NRPS, RiPPs and bacteriocins. BLASTP analysis revealed two sequences for MAG1 with 35.65% and 35.71% identity with the zoocin A production protein and three sequences with 35.96%, 43% and 45.65% identity with the zoocin A production protein for the MAG2. The third stage of the project aimed to collect and isolate bacteria present in/on fish of the *Serrasalmus rhombeus* species collected in the São Benedito River located in the state of Pará in Brazil and to detect the production of antimicrobial substances in these isolated bacteria. The analysis of 5 metagenomes from samples derived from fish and the analysis of 4 metagenomes from water samples was undertaken. The composition of the microbiomes and functional annotation of the are reported. 71 bacteria were isolated from *Serrasalmus rhombeus* species, of which 45 showed antimicrobial activity against human pathogens. Preliminary identification using mass spectrometry, matrix-assisted ionization and time-of-flight laser desorption (MALDI-TOF) allowed the identification of 48 bacteria. For the metagenomes from fish, the most common genera were: *Kocuria*, *Staphylococcus* and *Bacillus*. Except for 1C3, which showed a greater abundance of *Enterococcus* and *Macrococcus* bacteria. For water samples, the most common phyla were: Actinobacteria and Proteobacteria. They presented a greater abundance of the genera *Mycobacterium*. 14 fish sequences and three water sequences related to the production of bacteriocins were noted: zoocin A, linocin, closticin and lactococcin 972. Through this thesis, it was possible to verify that bacteria from the aquatic environment are promising in the production of antimicrobial substances, being an excellent environment to carry out bioprospecting.

Keywords: *Aeromonas*; *Acinetobacter*; Bacteriocins; Metagenome Assembled Genome (MAG); Fish; *Mugil brasiliensis* (tainha); *Caranx latus* (xerelete); *Serrasalmus rhombeus* (piranha preta); São Benedito River; Zoocin A; Linocin; Closticin; Lactococcin.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1: Introdução

- Figura 1:** Linha do tempo com os principais marcos na era dos antibióticos. 41
- Figura 2:** Mecanismos de ação das classes de antibióticos para inibir/ matar bactérias. 46
- Figura 3:** Principais mecanismos de resistência bacteriana. 49
- Figura 4:** Mecanismo de ação das bacteriocinas nas células alvo. 56
- Figura 5:** Aplicações biotecnológicas das bacteriocinas em tratamentos aplicados para alimentação e saúde humana. 58
- Figura 6:** Diversidade taxonômica de BGCs em filos de archaea e bactérias. 61
- Figura 7:** Peixes utilizados para o isolamento das bactérias do capítulo 3 e 4. 67
Espécies: *Mugil brasiliensis* e *Caranx latius*.
- Figura 8:** Lagoa Rodrigo de Freitas, localizada no estado do Rio de Janeiro, Brasil. 69
- Figura 9:** Mapa da localização do Rio São Benedito, localizado no estado do Pará. 70
- Figura 10:** Peixes popularmente encontrados no Rio São Benedito e selecionados para a coleta. 71
- Figura 11:** Apresentação cronológica das tecnologias de sequenciamento de DNA e avanços no estudo da biologia molecular. 75
- Figura 12:** Esquema dos capítulos 2,3 e 4 da tese. 85

Capítulo 2 - Artigo: *Aeromonas allosaccharophila* Strain AE59-TE2 Is Highly Antagonistic towards Multidrug-Resistant Human Pathogens, What Does Its Genome Tell Us?

- Figura 13:** Esquema do Material e métodos do capítulo 2 - Genômica da estirpe AE59-TE2. 88
- Figure 1:** Antimicrobial activity tests using *Aeromonas* sp. Producer strains against clinical and potentially pathogenic indicator strains. The 103

results of the antimicrobial activity tests were converted into positive (1) and negative (0) antimicrobial activity. A table of this data was used as an input for a hierarchical clustering. The numerical values were then converted into a color-code, where dark grey indicates that an inhibitory activity was observed.

- Figure 2:** Schematic circular diagram of the AE59 genome high lighting the main sequences cited in the text. From the most external circle inwards: first and Second (blue) – CDS in positive strand; and negative strand; The purple circle is a GC-skew in negative strand and in yellow is a GC-skew in a positive strand; the black circle is a G+C content. The genes annotated with the CARD tool are marked with red; rRNA are marked with pink and the tRNA are marked with light blue. **104**
- Figure 3:** MLSA resultant phylogenetic tree, using six housekeeping genes: *recA*, *gyrB*, *gltA*, *metG*, *groL* and 16S rRNA and 28 genomes from *Aeromonas* genus, inferred with Maximum Likelihood (ML) method and General Time Reversible model. The model evolutionary used was a discrete Gamma distribution. The bootstrap consensus was inferred from 1000 replicates. *Oceanimonas doudoroffi* ATCC 27123 was used as an outgroup. **105**
- Figure 4:** The heatmap showed the ANIb result. The main *Aeromonas* genus type strain was used to compare with the AE59-TE2 genome. The yellow color shows the most similar genome when compared with the AE59-TE2 genome. The value of yellow is 95.48% and represents *A. allosaccharophila* CECT 4199 genome. **106**
- Figure 5:** Functional RAST categories annotated for AE59 predicted sequences. **107**
- Figure 6:** Multiple alignments between Zoocin A protein, a peptidase, from the M23/M37 family from *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus* (UniProtKB / SwissProt accession number: O54308 and four sequences from the AE59-TE2 genome resulted from BLAST. The positions 340–474aa show the most conserved region. The Alignment was colored by conservation scheme; the regions with **109**

more conserved physicochemical properties are colored in orange (darker color) and the less conserved sites are colored in yellow (lighter color).

Figure 7: Functional annotation of orthologous groups with Kaas and KEGG Mapper Reconstruction tools annotated 6 categories of functional groups. **110**

Capítulo 3: *Metagenome Assembled Genome (MAG)* da cultura mista 38-XC4, isolada do peixe *Caranx latus (Xerelete)*, que é altamente antagônica a patógenos humanos.

Figura 14: Representação dos materiais e métodos utilizados no capítulo 3. **122**

Figura 15: Dendrograma mostrando o resultado do teste de atividade antimicrobiana de 22 estirpes do gênero *Aeromonas* spp. e a cultura mista 38-XC4 contra 16 estirpes indicadoras patogênicas. **130**

Figura 16: Mapa genômico circular do MAG1, *Acinetobacter pittii* ACP38-XC4, da cultura mista 38-XC4. **133**

Figura 17: Mapa genômico circular do MAG2, *Aeromonas salmonicida* AE38-XC4, da cultura mista 38-XC4. **134**

Figura 18: Mapa de calor com os resultados da análise ANI para o MAG1, *Acinetobacter pittii* ACP38-XC4. **135**

Figura 19: Mapa de calor com os resultados da análise ANI para o MAG2, *Aeromonas salmonicida* AE38-XC4. **136**

Figura 20: A árvore filogenética da análise MLSA da estirpe *Acinetobacter pittii* ACP38-XC4. **137**

Figura 21: A árvore filogenética da análise MLSA da estirpe AE38-XC4 *Aeromonas salmonicida*. **138**

Figura 22: Comparação da distribuição de *cluster* Genoma X Genoma. **141**

Figura 23: Matriz de similaridade para comparação dos genomas. **142**

Figura 24: A anotação funcional de grupos ortólogos com as ferramentas KAAS e KEGG Mapper Reconstruction do MAG2- *A. pittii* ACP38-XC4. **148**

Figura 25: A anotação funcional de grupos ortólogos com as ferramentas KAAS e KEGG *Mapper Reconstruction* do MAG2- *A. salmonicida* AE38-XC4. **149**

Figura 26: Alinhamento Múltiplo entre a proteína Zoocina A e três sequências do MAG1- *Acinetobacter pittii* ACP38-XC4, oriundas do resultado da análise do BLAST. **152**

Figura 27: Alinhamento Múltiplo entre a proteína Zoocina A e quatro sequências do MAG2- *Aeromonas salmonicida* AE38-XC4, oriundas do resultado da análise do BLAST. **153**

Capítulo 4: Bioprospecção de bacteriocinas em amostras de água e de peixes da espécie *Serrasalmus rhombeus* (nome popular: piranha preta) do Rio São Benedito, Pará.

Figura 28: Representação dos materiais e métodos utilizados no capítulo 4 (Parte I). **163**

Figura 29: Representação dos materiais e métodos utilizados no capítulo 4 (Parte II). **165**

Figura 30: Foto da pousada Thaimacu na beira do Rio São Benedito, PA-Brasil. **166**

Figura 31: Mapa com os pontos de coleta no Rio São Benedito, Pará. **167**

Figura 32: Peixes selecionados, considerando a diversidade local, para realizar a coleta das amostras. **169**

Figura 33: Região da coleta das amostras nos peixes. **170**

Figura 34:	Gráfico de barras empilhadas apresentando as estirpes indicadoras e produtoras de substâncias antimicrobianas.	187
Figura 35:	Amostras testadas para verificar a produção de substâncias antimicrobianas: I= Sr51; VI= Sr53 e VIII= Sr72-4P/ 1C1-XII (positiva para o teste). Como bactéria indicadora foi utilizada a <i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC.	188
Figura 36:	Abundância dos filos em cada metagenoma.	193
Figura 37:	Abundância dos gêneros em cada metagenoma.	195
Figura 38:	Mapa de calor apresentando os gêneros que representam pelo menos 20% das leituras em pelo menos um dos metagenomas.	197
Figura 39:	Alfa diversidade dos metagenomas, através dos índices de diversidade observada, Chao1 e Shannon.	200
Figura 40:	Beta diversidade dos metagenomas.	201
Figura 41:	Beta diversidade comparando os metagenomas oriundos do peixe e os metagenomas oriundos da água.	203
Figura 42:	Total de genes relacionados a resistência a antimicrobianos, anotados pela ferramenta KAAS e KEGG <i>Mapper Reconstruction</i> ,	205
Figura 43:	Vias metabólicas e a abundância relativa dos genes ortólogos anotados para cada metagenoma de peixes e de água.	206

- Figura 44:** *cluster* gênico *RiPP-like* (Outro produto peptídico sintetizado por ribossomo e modificado pós-tradução (RiPP) não especificado) anotado pela ferramenta AntiSMASH. **211**
- Figura 45:** Sequências de bacteriocinas encontradas para cada metagenomas. Apenas os metagenomas 377 e 387 não apresentaram bacteriocinas. **213**

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1: Introdução

Tabela 1: Principais classes de antibióticos, ano de descoberta e uso clínico, 42
microrganismo produtor e alvo molecular. Adaptada do artigo:
Hutchings, Truman & Wilkinson (2019).

Tabela 2: Tipos de sequenciamento genômico em larga escala - NGS 74

Capítulo 2 - Artigo: *Aeromonas allosaccharophila* Strain AE59-TE2 Is Highly Antagonistic towards Multidrug-Resistant Human Pathogens, What Does Its Genome Tell Us?

Tabela 3: Genomas completos de referência da espécie *Aeromonas veronii*, 90
obtidos no banco de dados NCBI e usados na montagem do genoma
da estirpe *Aeromonas allosaccharophila* AE59 pela plataforma
MeDuSa v. 1.3.

Tabela 4: Tabela com as estirpes oriundas do EZBio *Cloud* utilizadas na análise 91
DNA-DNA *in silico* da ferramenta GGDC.

Tabela 5: Genomas das estirpes tipo do gênero *Aeromonas* utilizadas na análise 93
MLSA para gerar a árvore filogenética.

Table 1: AE59-TE2 genome assembly statistics. These values represent the 103
main output of each assembly step, starting with the de novo
assembly carried out with SPAdes software and followed by two runs
of scaffolding conducted with the Medusa online server and *A.*
veronii complete genomes as references. The result generated after
the second scaffolding run represents the final AE59-TE2 assembly.
A flow chart of assembly steps is shown in Supplementary Figure S2.

Table 2: Bacteriocin-related genes of AE59-TE2 identified by RAST 108
functional annotation tool.

Table 3: BLAST result between AE59-TE2 annotation and bacteriocins from 108
UniProt Database.

Table 4: BLAST result between AE59-TE2 annotation and sequences from 109
the DoBiscuit Database.

Table 5: List of KEGG Biosynthesis of secondary metabolites Reference pathway. **110**

Table 6: Result keyword searches using PATRIC and PROKKA annotation. **111**
The key words that were searched: “endopeptidase, endonuclease, polyketide (PKS), antibiotic, colicin, microcin, zoocin, bacteriocin and streptomycin”.

Capítulo 3: *Metagenome Assembled Genome (MAG) da cultura mista 38-XC4, isolada do peixe *Caranx latus* (Xerelete), que é altamente antagônica a patógenos humanos.*

Tabela 6: Estirpes tipo utilizadas para gerar a árvore filogenética para o gênero *Aeromonas*, devido ao genoma MAG2- *Aeromonas salmonicida* AE38-XC4. **126**

Tabela 7: Estirpes tipo utilizadas para gerar a árvore filogenética para o gênero *Acinetobacter*, devido ao genoma MAG1- *Acinetobacter pittii* ACP38-XC4. **127**

Tabela 8: Dados oriundos do sequenciamento do genoma da estirpe AE38 (cultura mista 38-XC4). **131**

Tabela 9: Métricas das sequências brutas e filtradas da etapa de controle de qualidade da cultura mista 38-XC4. **132**

Tabela 10: Métricas de montagens do MAG da cultura mista 38-XC4. **132**

Tabela 11: Dados da anotação funcional realizada na plataforma PATRIC, utilizando diversas ferramentas. **140**

Tabela 12: Comparação entre os *bins* e os genomas representativos de cada espécie de estudo. **140**

Tabela 13: Resultado AntiSMASH e BLAST pela ferramenta UniProt para o MAG1 - *Acinetobacter pittii* ACP38-XC4. **144**

Tabela 14: Resultado AntiSMASH e BLAST pela ferramenta UniProt para o MAG2 - *Aeromonas salmonicida* AE38-XC4. **146**

Tabela 15: Resultado da busca por palavras-chaves na ferramenta OrthoVenn 2 **147**

Tabela 16: Análise das sequências oriundas do BLASTp contra o banco de dados BAGEL Classe III para o MAG1- *Acinetobacter pittii* ACP38-XC4. **150**

Tabela 17: Análise das sequências oriundas do BLASTp contra o banco de dados BAGEL Classe III para o MAG2- *Aeromonas salmonicida* AE38-XC4. **151**

Capítulo 4: Bioprospecção de bacteriocinas em amostras de água e de peixes da espécie *Serrasalmus rhombeus* (nome popular: piranha preta) do Rio São Benedito, Pará.

Tabela 18: Dados dos peixes e coordenadas da coleta no Rio São Benedito. **168**

Tabela 19: Amostras utilizadas na tese oriundas dos cinco indivíduos da espécie *Serrasalmus rhombeus* (nome popular: piranha preta) **170**

Tabela 20: Dados das amostras coletadas da água do Rio São Benedito com o filtro *Sterivex*TM. **171**

Tabela 21: Lista de bactérias patogênicas que foram utilizadas para o teste de antagonismo, como bactérias indicadoras. **173**

Tabela 22: Características fenotípicas das bactérias isoladas dos 5 indivíduos do peixe da espécie *Serrasalmus rhombeus* e identificação preliminar através da espectrometria de massa (MALDI-TOF). **179**

Tabela 23: Estatísticas geradas pelo CheckM para as montagens dos *contigs* pela ferramenta MetaSPAdes. **190**

Tabela 24:	Métricas geradas pela ferramenta CheckM para avaliar as montagens dos <i>bins</i> com a ferramenta MaxBin.	191
Tabela 25:	Comparação das bactérias isoladas dos peixes e a análise de classificação taxonômica dos metagenomas.	198
Tabela 26:	Total de genes ortólogos anotados para cada categoria de vias metabólicas, dados oriundos da ferramenta KAAS e KEGG <i>Mapper Reconstruction</i> .	204
Tabela 27:	Resultado dos plasmídeos anotados através da classificação taxonômica da ferramenta MG-RAST	207
Tabela 28:	Resultado da ferramenta ABRicate com os bancos de dados ARG-ANNOT, CARD, Ecoli_VF, EcOH, MEGARES, NCBI, PlasmidFinder, Resfinder e VFDB.	208
Tabela 29:	Resultado do AntiSMASH e BLAST pela ferramenta UniProt para os genes de biossíntese Central que foram encontrados nos metagenomas.	209
Tabela 30:	Resultado do BLASTp entre as amostras oriundas de peixes da espécie <i>Serrasalmus rhombeus</i> e os bancos de dados de substâncias antimicrobianas. Resultados dos bancos de dados BACTIBASE e BAGEL Classe III.	212
Tabela 31:	Resultado do BLASTp entre as amostras oriundas da água do Rio São Benedito e os bancos de dados de substâncias antimicrobianas.	213

SIGLAS E ABREVIATURAS

ANI	Identidade Média de Nucleotídeos (<i>Average Nucleotide Identity</i>)
AMR	Resistência Antimicrobiana (<i>Antimicrobial Resistance</i>)
APA	Água Peptonada Alcalina
ATCC	Coleção de Cultura Tipo Americana
BGCs	Agrupamentos de Genes Biossintéticos
BRP	Proteína de Liberação de Bacteriocina (<i>Bacteriocin Release Protein</i>)
CAMP	peptídeo Antimicrobiano catiônico
CAT	Domínio Catalítico (<i>Domain responsible for catalysis</i>),
CDS	Sequências Codificantes
COVID-19	Doença do Coronavírus (<i>Corona virus disease</i>)
DDH	Hibridização DNA-DNA <i>in silico</i> (<i>in silico DNA-DNA hybridization</i>)
ESBL	β -lactamases de Espectro Estendido
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Enterobacter cloacae</i> .
GRAS	Generally Recognized As Safe
GSP	Ágar Amido Glutamato Vermelho de Fenol (<i>Glutamate Starch Phenol Red Agar</i>)
GTR	Modelo Geral Reversível no Tempo (<i>General Time Reversible Model</i>)
kDa	Kilodaltons
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Produtora de Carbapenemase
LAB	Bactérias do Ácido Lático
LPS	Lipopolissacarídeos
MAG	Genoma Montado por Metagenoma (<i>Metagenome Assembled Genome</i>)
MALDI-TOF	Espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz por tempo de voo
MDR	Resistência a Múltiplas Drogas (<i>Multidrug-resistant</i>)
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MIC	Concentração Inibitória Mínima
ML	Método Máxima verossimilhança (<i>Maximum Likelihood</i>)
MLSA	<i>Multilocus Sequence Analysis</i>
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina

NDM	New Delhi metallo-beta-lactamase
NGS	Sequenciamento de Nova Geração (<i>Next-Generation Sequencing</i>)
NRPS	Peptídeo Sintetase Não-ribossomal (<i>Nonribosomal Peptide Synthetases</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
OTU	Unidade Taxonômica Operacional (<i>Operational taxonomic unit</i>)
OXA 23	Oxacilinase
PABA	Ácido para-aminobenzóico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PES	Membrana Millipore Express
PKS	Policetídeo Sintases
RiPPs	Peptídeos Sintetizados Ribossomicamente e modificados pós-traducionalmente (<i>Ribosomally Synthesized and Post-translationally Modified Peptides</i>)
ROS	Espécies reativas de oxigênio (<i>Reactive oxygen species</i>)
SBD	Domínio de ligação ao substrato (<i>Substrate-binding domain</i>)
SPM	São Paulo metallo-beta-lactamase
TCS	Correlação de Tetranucleotídeo (<i>Tetra Correlation Search</i>)
TETRA	Índice de Correlação de Assinatura de Tetranucleotídeo (<i>Correlation indexes of their Tetra-nucleotide signatures</i>)
TRD	Domínio responsável pelo reconhecimento do alvo (<i>Target recognition domain</i>)
VRE	<i>Enterococcus</i> resistentes à vancomicina
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à vancomicina
XDR	Extensamente resistente a medicamentos (<i>Extensively drug-resistant</i>)

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	19
SIGLAS E ABREVIATURAS	23
PREFÁCIO	30
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	33
1.1 Substâncias antimicrobianas	36
1.2 O histórico dos antibióticos	39
1.2.1 Classes dos antibióticos	42
1.2.2 Mecanismo de ação	44
1.2.3 Resistência bacteriana aos antibióticos	46
1.3 Bacteriocinas	49
1.3.1 Classificação das bacteriocinas	52
1.3.2 Mecanismo de ação	54
1.3.3 Aplicação biotecnologia	56
1.4 Bactérias produtoras de substâncias antimicrobianas e o ambiente aquático	58
1.4.1 O gênero <i>Aeromonas</i>	64
1.4.2 O gênero <i>Acinetobacter</i>	66
1.5 Ambiente de coleta: Peixes de feira livre, Lagoa Rodrigo de Freitas e Rio São Benedito.	67
1.6 A era das ômicas	71

1.6.1 Genômica	72
1.6.2 Metagenômica	76
JUSTIFICATIVA	80
OBJETIVOS	81
Objetivo Geral	81
Objetivos Específicos	81
ORGANIZAÇÃO DOS CAPÍTULOS	83
CAPÍTULO 2: <i>Aeromonas allosaccharophila</i> Strain AE59-TE2 Is Highly Antagonistic towards Multidrug-Resistant Human Pathogens, What Does Its Genome Tell Us?	86
2.1 Introdução	87
2.2 Materiais e métodos	87
2.2.1 Bactéria de estudo, atividade antimicrobiana e espectro de ação	87
2.2.2 Extração de DNA e sequenciamento	89
2.2.3 Processamento de dados e montagem do genoma da estirpe AE59-TE2	90
2.2.4 Identificação taxonômica da estirpe AE59-TE2	91
2.2.5 Potencial de virulência e resistência a antibióticos	94
2.2.6 Anotação Funcional e visualização do genoma	95
2.2.7 Busca de genes/Proteínas relacionadas à produção de substâncias antimicrobianas	95
2.3 Artigo Publicado	97

CAPÍTULO 3: Metagenome Assembled Genome (MAG) da cultura mista 38-XC4, isolada do peixe *Caranx latus* (Xerelete), que é altamente antagônica a patógenos humanos. 119

3.1 Introdução	120
3.2 Materiais e métodos	121
3.2.1 Cultura mista 38-XC4, atividade antimicrobiana e espectro de ação	123
3.2.2 Extração de DNA e sequenciamento Illumina	123
3.2.3 Processamento de dados e montagem dos <i>contigs</i> e <i>bins</i> pela técnica <i>Metagenome Assembled Genome</i> (MAG) e Diagrama do Mapa circular dos <i>bins</i>	123
3.2.4 Taxonomia e arquivo consenso das sequências do gene que codifica o rRNA 16S	124
3.2.5 Anotação funcional e comparação dos <i>bins</i> com os genomas de referência	128
3.2.6 Mineração de genes relativos à atividade antimicrobiana	128
3.3 Resultados	129
3.3.1 Cultura mista 38-XC4, atividade antimicrobiana e espectro de ação	129
3.3.2 Extração de DNA e sequenciamento Illumina	131
3.3.3 Processamento de dados e montagem dos <i>contigs</i> e <i>bins</i> pela técnica <i>Metagenome Assembled Genome</i> (MAG)	131
3.3.4 Identificação taxonômica dos <i>bins</i>	135
3.3.5 Anotação funcional e comparação com genomas de referência	139
3.3.6 Mineração de genes relativos à atividade antimicrobiana	143
3.4 Discussão	154
3.5 Conclusão	159

CAPÍTULO 4: Bioprospecção de bacteriocinas em amostras de água e de peixes da espécie *Serrasalmus rhombeus* (nome popular: piranha preta) do Rio São Benedito, Pará. 160

4.1 Introdução	161
4.2 Materiais e Métodos	162
4.2.1 Parte I:	166
4.2.1.1 Coleta das amostras	166
4.2.1.1.1 Local de coleta	166
4.2.1.1.2 Seleção dos peixes e coleta das amostras dos peixes	167
4.2.1.1.3 Coleta das amostras de água	171
4.2.1.2 Isolamento e identificação das estirpes do peixe	172
4.2.1.3 Detecção da produção de substância antimicrobiana	172
4.2.1.3.1 Estirpes bacterianas clínicas utilizadas como indicadoras para os testes de produção de substâncias antimicrobianas para todos os gêneros produtores de estudo.	172
4.2.1.3.2 Teste de detecção da produção de substância antimicrobiana	174
4.2.2 Parte II: Metagenômica das amostras oriundas de peixes e das amostras de água	174
4.2.2.1 Extração de DNA e Sequenciamento shotgun do metagenoma completo das amostras de peixe e de águas coletadas	174
4.2.2.2 Processamento dos dados e Montagem dos <i>contigs</i> e <i>bins</i>	175
4.2.2.3 Avaliação da Biodiversidade - Classificação taxonômica dos metagenomas	175
4.2.2.4 Avaliação Funcional de Metagenomas e Anotação das montagens dos <i>contigs</i>	176

4.2.2.5 Mineração de Genes Relativos a Substâncias Antimicrobianas em Metagenomas	177
4.3 Resultados	177
4.3.1 Parte I: Isolamento e identificação das bactérias oriundas dos peixes e detecção da produção de substâncias antimicrobianas	177
4.3.1.1 Isolamento das Bactérias dos peixes <i>Serrasalmus rhombeus</i> e Identificação preliminar (MALDI-TOF)	177
4.3.1.2 Detecção de produção de substâncias antimicrobianas	186
4.3.2 -Parte II: Metagenômica das cinco amostras oriundas da região (C) Ânus dos peixes <i>Serrasalmus rhombeus</i> e quatro amostras de água do Rio São Benedito, Pará.	189
4.3.2.1 Extração de DNA e sequenciamento shotgun do metagenoma completo das amostras de peixe e de águas coletadas	189
4.3.2.2 Processamento dos dados e montagem dos <i>contigs</i> e <i>bins</i>	189
4.3.2.3 Avaliação da biodiversidade - classificação taxonômica dos metagenomas	192
4.3.2.4 Avaliação Funcional de Metagenomas e Anotação das montagens dos <i>contigs</i>	204
4.3.2.5 Mineração de Genes Relativos a Substâncias Antimicrobianas em Metagenomas	209
4.4 Discussão	214
4.4.1 Bactérias antagonistas isoladas de água e peixes	214
4.4.2 Diversidade bacteriana	216
4.4.3 As categorias funcionais dos metagenomas do Rio São Benedito e das piranhas – biorremediação	219
4.4.3.1 Genes relacionados de biodegradação de xenobióticos	219
4.4.3.2 Genes relacionados aos plasmídeos	220

4.4.4 Substâncias antimicrobianas nos metagenomas	220
4.5 Conclusões	226
DISCUSSÃO E CONCLUSÃO GERAL	227
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	233
APÊNDICE	268
1 Introdução contendo os resultados da dissertação de Silva, 2018.	269
ANEXOS	274
1 Produtividade no período do doutorado	275
1.1 Artigos publicados como primeira autora	275
1.2 Artigos publicados	276
1.3 Artigos em produção relacionados a tese	276
2 Atividades extras na pós-graduação	277
3 <i>Link</i> do Currículo lattes	277

PREFÁCIO

A bioprospecção de novas substâncias antimicrobianas representa uma das linhas de pesquisas desenvolvidas pelo Laboratório de Genética de Microrganismos Associados a Alimentos e à Indústria (LGMAI), liderado pela professora Dra. Selma Soares de Oliveira. Esta linha tem recebido grande contribuição da área de bioinformática, a qual vem sendo desenvolvida pelo Laboratório de Biotecnologia Sustentável e Bioinformática Microbiana (LBSBM) liderado pelo professor Dr. Andrew Macrae. Juntando esses dois universos de pesquisa, pode-se aprofundar os conhecimentos para investigar diversos ambientes em busca de bactérias produtoras de substâncias antimicrobianas, bem como realizar análises genômicas e metagenômicas em estirpes/amostras relevantes. O desenvolvimento desta linha tem resultado em trabalhos que trazem importantes contribuições a respeito da presença de estirpes produtoras de substâncias antimicrobianas em diversos ambientes, como: aquáticos, extremos na Antártica, de isolados de mastite bovina e de peixes.

A busca por substâncias antimicrobianas que são capazes de inibir o crescimento ou matar microrganismos patogênicos é de grande importância nos dias atuais, tanto para a indústria farmacêutica, para a confecção de novos antibióticos, como nas indústrias alimentícias, para a produção de conservantes naturais. As substâncias antimicrobianas são agentes químicos, produzidos naturalmente para a defesa do organismo, e as principais estudadas são os antibióticos e os peptídeos antimicrobianos produzidos por bactérias, as bacteriocinas. Bactérias de ambiente aquático são candidatas promissoras na produção dessas substâncias. Com isso, na dissertação de mestrado de Silva (2018) foi investigada a produção de substâncias antimicrobianas por 57 bactérias isoladas, identificadas como pertencentes ao gênero *Aeromonas* oriundas de peixes das espécies *Mugil brasiliensis* e *Caranx crysos*, e de bactérias isoladas da Lagoa Rodrigo de Freitas. Silva (2018) descreve o estado da arte referente ao antagonismo de bactérias do gênero *Aeromonas* frente a bactérias que podem causar infecções em humanos. Para realizar o teste de antagonismos, foram utilizadas diversas estirpes de importância clínica e algumas bactérias patogênicas pertencentes ao grupo ESKAPE, como: *Acinetobacter baumannii*, não produtora de OXA 23; *Escherichia coli* ESBL; *Enterococcus cloacae* NDM;

Enterococcus faecalis; *Klebsiella pneumoniae* KPC; *Klebsiella pneumoniae* ESBL; *Pseudomonas aeruginosa* SPM; *Pseudomonas aeruginosa* não produtora de SPM; *Salmonella typhimurium* ATCC 14028; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Após realizar os testes de antagonismo, foram detectadas 38 estirpes produtoras de substâncias antimicrobianas (Tabela I - Apêndice) e todas foram identificadas preliminarmente por testes bioquímicos (Tabela II - Apêndice). Foram selecionadas duas amostras com diferentes espectros de ação, sendo a estirpe bacteriana AE59-TE2 com um amplo espectro de ação e a estirpe AE38, com um espectro de ação menor, inibindo os gêneros *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*. Essas estirpes tiveram o seu DNA extraído para realizar o sequenciamento do genoma e fazer as análises preliminares de bioinformática, como a identificação de genes relacionados à produção de substâncias antimicrobianas, busca de genes relacionados à virulência e realizar a classificação taxonômica.

Neste trabalho de tese, a amostra isolada AE59-TE2 foi amplamente estudada, com aprofundamento das buscas por genes relacionados à produção de substâncias antimicrobianas e a realização de análises mais profunda para corroborar com os resultados obtidos anteriormente, o de classificação taxonômica (Silva, 2018). Já a “estirpe AE38”, após uma nova análise, verificou-se que se tratava de uma cultura mista, nomeada nesta tese de 38-XC4. Nesta tese, os genomas da cultura mista foram montados com a técnica *Metagenome Assembled Genome* (MAG), para a identificação posterior de genes de interesse. Todos os isolados e amostras coletadas para o trabalho de mestrado apresentado em Silva (2018), foram oriundos de peixes de feira livre e de ambiente aquático com grande interferência humana. Então levantou-se a hipótese de que amostras de água e de peixes são interessantes para realizar a bioprospecção de bactérias antagonistas de bactérias patogênicas humanas. Foi explorado o Rio São Benedito- PA, sendo possível comparar a água do rio e os peixes como fontes de bacteriocinas.

Capítulo 1
Introdução

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

Um dos grandes problemas na área da saúde e na sociedade são as doenças infecciosas causadas por microrganismos multirresistentes a diversos antibióticos, sendo esta, a segunda causa mais importante de morte humana globalmente (Hemeg, 2017; Mühlberg *et al.*, 2020; Guo *et al.*, 2020). Bactérias resistentes causam aproximadamente 700 mil mortes anuais em todo mundo (Plackett, 2020). Muitas bactérias conseguem driblar os mecanismos de ação dos antibióticos e com isso, resistem à presença dessas substâncias, causando severos danos à sociedade (Hemeg, 2017). As resistências aos antibióticos podem ser classificadas como: resistência intrínseca, que é um mecanismo de resistência endógena e a resistência adquirida, que pode passar de uma bactéria para outra (Anuj *et al.*, 2019). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a resistência bacteriana a drogas tem crescido em grande escala e com isso é considerada um grande problema de saúde pública em vários países (OMS, 2014). O controle de microrganismos resistentes é fundamental, sendo assim, a busca por substâncias antimicrobianas, sendo elas bactericidas ou bacteriostáticas, faz-se cada vez mais necessária nos dias atuais (Raheem & Straus, 2019), tanto para a indústria farmacêutica, na confecção de novos antibióticos, como também nas indústrias alimentícias, produzindo novos conservantes naturais.

A investigação de substâncias antimicrobianas é de grande importância para a obtenção de novas opções de tratamento das infecções causadas por bactérias, haja visto o problema de resistência bacteriana aos antibióticos. É também de grande valor biotecnológico a descoberta de novos conservantes que possam ser utilizados nas indústrias de alimentos e de cosméticos. Este é o caso da nisina, uma bacteriocina autorizada para ser utilizada como conservante de alimentos, como: vegetais, laticínios, queijos, carnes (Sarkar *et al.*, 2017). Outra aplicação das substâncias antimicrobianas é o seu uso como probióticos, que utilizam o microrganismo vivo para beneficiar a saúde (Kim *et al.*, 2019). Uma aplicação de conhecimento comum, especialmente quando aplicado na saúde humana, como no tratamento de distúrbios gastrointestinais.

As substâncias antimicrobianas são agentes químicos, produzidos naturalmente por diversos organismos, para sua própria defesa ou fabricados semi-sinteticamente e sinteticamente, como os quimioterápicos (Sáez-Ilorens, 2000), e apresentam diferenças nos espectros e mecanismos de ação (Tavares, 1990; Hudson & Lockless, 2022). Existem diversas substâncias antimicrobianas como: enzimas, ácidos orgânicos, antibióticos, peróxido de hidrogênio, lipopeptídeos, peptídeo não ribossômico sintetase (NRPS), policetídeo sintases (PKS) e os peptídeos antimicrobianos, que englobam as bacteriocinas (Fira *et al.*, 2018). Os antibióticos e as bacteriocinas são os principais grupos de estudo neste trabalho. As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos capazes de inibir o crescimento ou matar outros microrganismos, sendo as bactérias produtoras imunes a esta substância (Mahlapu *et al.*, 2016). Apresentam um menor espectro de atividade que em relação aos antibióticos (Madigan *et al.*; 2004).

Na literatura há relatos de diversos gêneros capazes de produzir substâncias antimicrobianas, tanto entre as bactérias classificadas como Gram-positivas como entre as Gram-negativas. As bactérias produtoras podem ser encontradas em diversos ambientes, como em solos, ambientes aquáticos e em animais, como os peixes. É de conhecimento comum, que o ambiente aquático possui uma biodiversidade vasta e que formam 70% da superfície do planeta Terra. Em relação aos microrganismos, neste ambiente existem diversos gêneros para serem estudados. Devido a essa diversidade, há uma grande competição por nutrientes e espaço, fazendo com que as bactérias produzam diversas substâncias que as auxiliam na competição (Riley & Wertz, 2002; Perez, Zendo & Sonomoto, 2022). Já existem relatos de estirpes isoladas de ambiente aquático que podem produzir substâncias antimicrobianas. Alguns gêneros são comumente encontrados em peixes, como por exemplo, os gêneros *Vibrio* e *Aeromonas*. Nguyen e colaboradores (2014) afirmam que as bacteriocinas podem ser encontradas em diversas espécies bacterianas, tanto as bactérias de ambiente terrestre como também de ambiente aquático. Sendo assim, fizeram a bioprospecção em ambiente aquático, e foram capazes de isolar 100 bactérias de animais marinhos de interesse na aquicultura e dentre essas, 24 estirpes mostraram atividade antimicrobiana, sendo sete estirpes produtoras de substâncias com características semelhantes à bacteriocina. Foi possível analisar a biodiversidade dos produtores de bacteriocinas e almejar futuras aplicações destas moléculas na aquicultura.

Dentro deste contexto, o objetivo desta tese foi avaliar o potencial de produção de substâncias antimicrobianas em bactérias oriundas de ambientes aquáticos e comparar os resultados obtidos na bancada e *in silico*, por meio de ferramentas de bioinformática. Esta tese foi dividida em quatro capítulos: O primeiro capítulo apresenta a introdução e contextualização do tema. O segundo capítulo avalia o genoma da estirpe AE59-TE2, uma bactéria com alto potencial antimicrobiano, que possui atividade contra diversas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas de importância clínica, que possuem múltiplas-resistências aos antibióticos, como: *Klebsiella pneumoniae* KPC, *Escherichia coli* ESBL, *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*. O terceiro capítulo apresenta a análise metagenômica de uma cultura mista, nomeada 38-XC4, a qual inclui duas bactérias: AE38-XC4 e ACP38-XC4, que apresentam atividade antimicrobiana contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*. O quarto capítulo apresenta a coleta e isolamento das bactérias presentes na microbiota de cinco peixes da espécie *Serrasalmus rhombeus* e análises dos metagenomas das amostras oriundas dos peixes e de água do Rio São Benedito. Por fim há uma discussão geral e conclusão englobando todos os capítulos.

1.1 - Substâncias antimicrobianas

Substâncias antimicrobianas, são compostos produzidos por diversos organismos, desde as plantas, animais e também microrganismos como as bactérias. Um exemplo é o homem, que produz um peptídeo antimicrobiano na mucosa, nomeado lactoferrina que é uma glicoproteína de ligação ao ferro com atividade contra microrganismos e pode aumentar a resposta imune inata contra o coronavírus (COVID-19) (Apostolopoulos *et al.*, 2021). Muitas plantas também são capazes de produzir compostos com atividade antimicrobiana, em um trabalho recente foi isolado e identificado os compostos do alho para o tratamento de infecções causadas por *Streptococcus agalactiae*, como bacteremia, pneumonia e meningite (Torres *et al.*, 2021). Outras plantas que também possuem atividade antimicrobiana são os *cranberries* que apresentam compostos fenólicos como proantocianidinas que atuam sobre o biofilme, interrompendo-o (Prince, Roy & McDonald, 2022). As bactérias são grandes produtoras de substâncias antimicrobianas, podendo produzir diversos compostos bioativos (Desriac *et al.*, 2013). Como as bactérias do ácido láctico que produzem substâncias antimicrobianas nomeadas de bacteriocinas (Perez, Zendo & Sonomoto, 2022).

As substâncias antimicrobianas podem apresentar efeito bactericida, como o antibiótico floxacina, que inibe a replicação por ligação irreversível à DNA girase ou efeito bacteriostático que apenas inibe o crescimento do microrganismo alvo, como o antibiótico tetraciclina, que inibe a síntese proteica por ligação reversível aos ribossomos (Eguchi, 2007; Yang *et al.*, 2014). Existem diversos tipos de substâncias antimicrobianas, por exemplo: os ácidos orgânicos, antibióticos, peróxido de hidrogênio, lipopeptídeos, peptídeo não ribossômico sintetase (NRPS), policetídeo sintases (PKS), peptídeos sintetizados a nível dos ribossomos e modificados pós-traducionalmente (RiPPs), terpenóides e os peptídeos antimicrobianos, como as bacteriocinas produzidas por bactérias (Fira *et al.*, 2018).

Os ácidos orgânicos conhecidos por terem atividades antimicrobianas são ácidos de cadeia curta como os ácidos monocarboxílicos simples e os ácidos carboxílicos contendo um grupo hidroxila. Exemplo de ácidos monocarboxílicos simples são: ácidos fórmicos, ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico; já os ácidos carboxílicos contendo um grupo hidroxila, são: os ácidos lácticos, ácido málico, ácido tartárico e o ácido cítrico (Ricke, 2003). Os ácidos orgânicos já são utilizados como aditivos alimentares, atuando na conservação dos alimentos (Ricke, 2003; Burns *et al.*, 2021). Alguns ácidos orgânicos específicos são utilizados também nas etapas de produção e processamento no pré e pós-colheita (Ricke, 2003). O trabalho de Burns e colaboradores (2021) apresentou diversos ácidos orgânicos fracos: ácido cítrico, málico, propiônico, mandélico, láctico, benzóico, pirúvico e hipúrico, que possuem atividade contra microrganismos uropatógenos e conseguem prevenir a formação de biofilmes, apresentando também atividade sinérgica contra *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Burns *et al.*, 2021).

Existem enzimas com atividades antimicrobianas e estas são produzidas para a defesa do organismo, sendo parte do sistema de defesa inato (Cao *et al.*, 2020). Entre os mecanismos de ação destas enzimas está a inibição da formação de biofilmes. Entre elas, estão as enzimas proteolíticas, como as subtilisinas, que já são utilizadas pelas indústrias no controle de biofilme dos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudoalteromonas* sp. (Cao *et al.*, 2020). Outras enzimas importantes são as enzimas de degradação de polissacarídeos, como a lisozima, que atua comprometendo a parede celular das bactérias, clivando as ligações β -(1,4)-glicosídicas nos peptidoglicanos, levando à lise das bactérias. A lisozima é muito utilizada em indústrias

alimentícias, prevenindo a formação de biofilme por bactérias degradadoras de alimentos (Nawaz *et al.*, 2022).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) atua como um antisséptico e é utilizado na limpeza de feridas, sob a concentração de 3% (Zhu *et al.*, 2017). Outras substâncias com atividade antibacteriana são os lipopeptídeos, produzidos pelo metabolismo secundário de microrganismos, atuando contra bactérias e fungos. São moléculas anfifílicas, compostas por uma cadeia lipídica ligada ao peptídeo e também possuem atividade anticancerígenas (Jujjavarapu & Dhagat, 2018). Já foram descritos lipopeptídeos produzidos por bactérias do gênero *Bacillus*, essas substâncias são pequenos metabólitos que possuem uma estrutura cíclica de 7 a 10 aminoácidos, contendo o 2-4D-aminoácido e um ácido graxo beta-hidroxi com 13 a 19 átomos de C (Zhao *et al.*, 2017). As bactérias da espécie *Bacillus velezensis* são conhecidas por possuírem agrupamentos de genes biossintéticos, que codificam compostos antimicrobianos, como os lipopeptídeos e os policetídeos (Fazle Rabbee & Baek, 2020).

Os peptídeos antimicrobianos são biomoléculas com atividade antimicrobiana contra diversos patógenos (González García *et al.*, 2020). As sequências contêm em torno de 10 a 100 aminoácidos com carga positiva e anfifílicos. Estes peptídeos podem ser utilizados para fazer o controle de microrganismos patogênicos (Apostolopoulos *et al.*, 2021). Todos os organismos vivos são capazes de produzir peptídeos antimicrobianos, esses peptídeos também são conhecidos como peptídeos de defesa do hospedeiro (Cole & Nizet, 2016; Cao *et al.*, 2020). Em comparação com os antibióticos, os peptídeos antimicrobianos não apresentam uma atividade tão forte, porém possuem atividade capaz de matar microrganismos patogênicos (Cao *et al.*, 2020). Há uma variedade de peptídeos antimicrobianos encontrados em organismos, que vão de bactérias a mamíferos, estes estão sendo apontados como alternativas promissoras no combate a infecções por microrganismos (Mahlapuu *et al.*, 2016). Um dos mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos está relacionado com a interação com a membrana, podendo inibir suas funções (Kohanski *et al.*; 2010) e desestabilizar a sua integridade (Bruno & Montiville, 1993).

As bactérias são grandes produtoras de peptídeos antimicrobianos. A classificação desses peptídeos varia de acordo com a sua síntese. As sintetizadas à nível de ribossomos são nomeadas de bacteriocinas e existem também os sintetizados via não-ribossômica, como pela via de peptídeos não ribossômico sintetase (NRPS) (Desriac *et al.*, 2013). Estes, são compostos por ligação de aminoácidos e são exemplos de peptídeos

naturalmente modificados. Diferente dos peptídeos sintetizados à nível de ribossomos, os NRPS podem incorporar mais de 100 aminoácidos e esses aminoácidos podem ser modificados pela própria NRPS, aumentando a diversidade desses compostos (Desriac *et al.*, 2013). As NRPS possuem vários módulos e cada um incorpora e modifica o substrato de aminoácido, estendendo o produto polipeptídico. Exemplos desses produtos são: o antibiótico Daptomicina, o antitumoral Actinomicina D e o imunossupressor Ciclosporina A. As NRPS podem ser classificadas conforme a sua organização e mecanismos catalíticos em dois grupos: A NRPS modular tipo I, com a organização hierárquica do complexo, sendo enzima-subunidade-módulo-domínio (Hwang *et al.*, 2020) e o segundo grupo nomeado NRPS autônomo tipo II, possuem domínios autônomos ou mínimos. Neste grupo de NRPS existem diversas enzimas que produzem metabólitos bioativos (Jaremko *et al.*, 2020).

Os policetídeos sintases (PKS) é um tipo de sistema enzimático envolvidos na síntese de produtos naturais, como os policetídeos. Podem ser produzidos por bactérias, fungos e plantas, possuem atividade antimicrobiana e são utilizados clinicamente (Desriac *et al.*, 2013). Podem ser divididos em três classes, sendo os PKS tipo I os macrolídeos; os PKS tipo II são moléculas aromáticas e os PKS tipo III são compostos por moléculas aromáticas pequenas (Qi *et al.*, 2020). Exemplos de PKS tipo I são: o antibiótico Eritromicina, o Imunossupressor Rapamicina e o antifúngico Anfotericina B (Hwang *et al.*, 2020).

Os antibióticos e as bacteriocinas são substâncias com atividade antimicrobiana bastante conhecidas e relatadas na literatura. Os antibióticos são produtos do metabolismo secundário, já as bacteriocinas são sintetizadas à nível de ribossomos. Ambos serão detalhados nos próximos tópicos.

1.2 - O histórico dos antibióticos

A descoberta dos antibióticos foi um marco importantíssimo para a sociedade, desde a implementação do primeiro antibiótico, nomeado de salvarsan, em 1910 grandes avanços ocorreram. Após 100 anos desta descoberta, a expectativa de vida humana aumentou em mais 23 anos (Hutchings, Truman & Wilkinson, 2019). O antibiótico salvarsan foi desenvolvido sinteticamente por Paul Ehrlich, utilizando arsênio e foi utilizado para o tratamento de sífilis, combatendo o agente causador *Treponema pallidum*.

Mais tarde este medicamento foi substituído pelo pró-fármaco sulfonamida prontossil, desenvolvido pelo pesquisador Gerhard Domagk que deu continuidade ao trabalho de Paul Ehrlich, pois tinha a motivação de salvar o braço de sua filha. Os primeiros antimicrobianos eficazes com amplo espectro foram as sulfonamidas, embora tendo seu uso reduzido após a descoberta da penicilina, ainda há utilização deste antibiótico atualmente (Hutchings, Truman & Wilkinson, 2019).

Em 1928, o pesquisador Fleming descobriu a penicilina, por meio de uma contaminação observada em sua placa de petri, e foi o pioneiro na Era de ouro da descoberta dos antibióticos, usando-os para o tratamento de infecções (Klein *et al.*, 2017; Hutchings, Truman & Wilkinson, 2019; Guo *et al.*, 2020). Posteriormente os pesquisadores Norman Heatley, Howard Florey, Ernst Chain purificaram a penicilina. Em 1945 a estrutura beta-lactâmica foi compreendida por Dorothy Hodgkin, possibilitando a produção de antimicrobianos semi-sintéticos derivados da penicilina (Hutchings, Truman & Wilkinson, 2019). Em 1950, após anos de uso generalizado da penicilina e devido à falta de conhecimento da população, começaram a surgir bactérias resistentes a esse antibiótico, como estirpes de *S. aureus* que produzem a enzima penicilinase capaz de hidrolisar o anel β -lactâmico da penicilina (Pichereau e Rose, 2010, Guo *et al.*, 2020).

Em 1959, para resolver esse problema os cientistas desenvolveram um novo antibiótico nomeado de metilina que é um antibiótico semi-sintético da classe das penicilinas, capaz de resistir a penicilinase, enzima que confere resistência à penicilina (Khoshnood *et al.*, 2019). Porém em 1961, foi isolada uma estirpe bacteriana de *S. aureus* MRSA capaz de resistir a esse novo antibiótico (Schulte e Munson, 2019).

Os antibióticos consistem em substâncias produzidas pelo metabolismo secundário microbiano que, em pequenas quantidades, inibem o crescimento de outros microrganismos. Podem ser produzidos semi-sinteticamente e sinteticamente, facilitando assim o tratamento de diversas doenças. Eles diferem pelas suas propriedades químicas, espectro e mecanismo de ação (Tavares, 1990; Guimarães, Momesso & Pupo, 2010).

O trabalho de Hutchings, Truman & Wilkinson (2019) apresentou a linha do tempo com os principais marcos na era dos antibióticos. Eles apresentaram o período em que cada antibiótico foi inserido no mercado, assim como as datas em que foram reportadas as primeiras resistências a cada antibiótico. Os autores também apresentaram as primeiras estirpes resistentes aos determinados antibióticos: *S. aureus* resistente à metilina (MRSA), *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE), *S. aureus* resistente

à vancomicina (VRSA) e resistência à colistina transmitida por plasmídeo em Enterobacteriaceae.

A linha do tempo com os principais marcos na era dos antibióticos está apresentada na Figura 1.

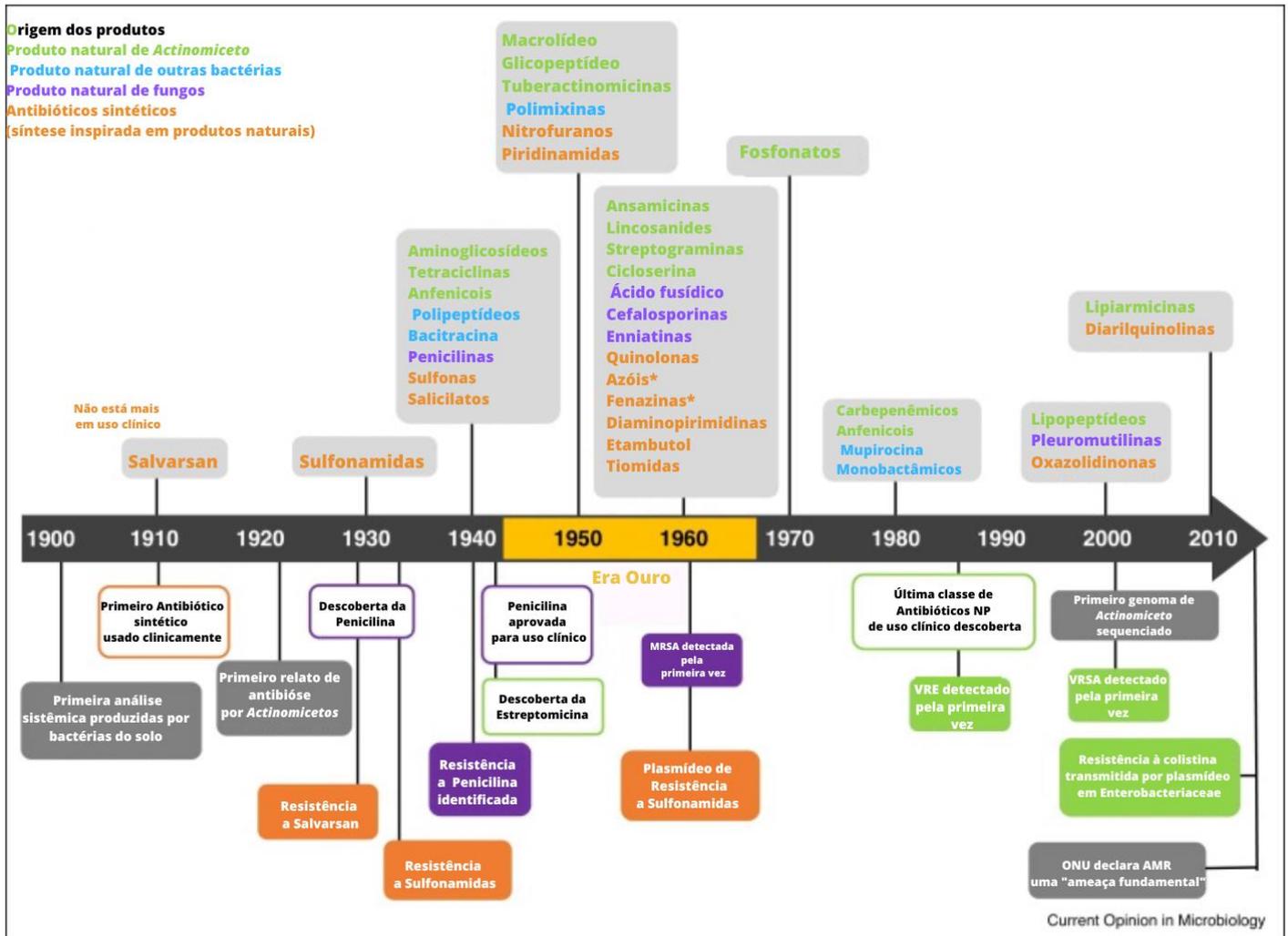


Figura 1: Linha do tempo com os principais marcos na era dos antibióticos. Os antibióticos foram destacados pela cor, a cor verde representa os antibióticos oriundos de actinomicetos; a cor azul representa que são de origem de outras bactérias; a cor roxa representa que o organismo de origem são fungos, já a cor laranja representa que o antibiótico foi produzido sinteticamente. Figura adaptada do artigo Hutchings, Truman & Wilkinson (2019).

1.2.1 Classes dos antibióticos

Algumas das principais classes de antibióticos são: os β -lactâmicos, aminoglicosídeos, macrolídeos, cloranfenicol, tetraciclina, lincosamidas, glicopeptídeos, lipodepsipeptídeos, rifamicinas, estreptograminas, sulfonamidas e trimetoprim (sulfas), quinolonas e fluoroquinolonas e oxazolidinonas (Melo *et al.*, 2012). A tabela 1, retirada do artigo de Hutchings, Truman & Wilkinson (2019), apresenta as classes de antibióticos conhecidas, o ano de descoberta reportado na literatura, ano que foram utilizadas clinicamente, exemplos das classes e organismo produtor e o alvo molecular de cada classe.

Tabela 1: Classes de antibióticos, ano de descoberta e uso clínico, microrganismo produtor e alvo molecular. Adaptada do artigo: Hutchings, Truman & Wilkinson (2019).

Classe (a)	Descoberta(b)/ Uso	Exemplo	Alvo molecular
Antibióticos de actinomicetos			
Aminoglicosídeos	1944 /1946	Canamicina A (<i>Streptomyces kanamyceticus</i>)	Síntese de proteínas: subunidade ribossomal 30S
Tetraciclina	1948/1948	Tetraciclina (<i>Streptomyces aureofaciens</i>)	Síntese de proteínas: subunidade ribossomal 30S
Anfenicóis	1947/1949	Cloranfenicol (<i>Streptomyces venezuelae</i>)	Síntese de proteínas: subunidade ribossômica 50S
Macrolídeos	1952/1952	Eritromicina (<i>Saccharopolyspora erythraea</i>)	Síntese de proteínas: subunidade ribossômica 50S
Tuberactinomicinas	1951/1953	Viomicina (<i>Streptomyces puniceus</i>)	Síntese de proteínas: subunidades ribossomais 30S e 50S (liga-se à ponte inter subunidades B2a)
Glicopeptídeos	1954/1958	Vancomicina (<i>Amycolatopsis orientalis</i>)	Síntese da parede celular: terminais D-Ala-D-Ala do lipídio II
Lincosamidas	1962/1963	Clindamicina Derivado semi-sintético da lincomicina (<i>Streptomyces lincolnensis</i>)	Síntese de proteínas: subunidade ribossômica 50S
Ansamincinas	1959/1963	Rifamicina SV Derivado semi-sintético da rifamicina (<i>Amycolatopsis rifamycinica</i>)	Síntese de ácido nucleico: RNA polimerase

Continuação da Tabela 1

Classe (a)	Descoberta(b)/ Uso	Exemplo	Alvo molecular
Cicloserinas	1955/1964	Seromicina (<i>Streptomyces orchidaceus</i>)	Síntese da parede celular: inibição da alanina racemase e D-alanina-D-alanina ligase
Estreptograminas	1953/1965	Pristinamicina (<i>Streptomyces pristinaespiralis</i>)	Síntese de proteínas: subunidade ribossômica 50S
Fosfonatos	1969/1971	Fosfomicina (<i>Streptomyces fradiae</i>)	Síntese da parede celular: inibição de MurA (UDP-GlcNAc-3-enolpiruviltransferase)
Carbapenêmicos	1976/1985	Meropenem Molécula sintética à base de tienamicina (<i>Streptomyces cattleya</i>)	Síntese da parede celular: proteínas de ligação à penicilina
Lipopeptídeos	1987/2003	Daptomicina (<i>Streptomyces roseosporus</i>)	Ruptura da membrana celular.
Lipiarmicinas	1975/2011	Fidaxomicina (<i>Dactylosporangium aurantiacum</i> subsp. <i>hamdenesis</i>)	Síntese de ácido nucleico: RNA polimerase
Antibióticos de outras bactérias			
Polipeptídeos	1939/ 1941	Gramicidina A (<i>Bacillus brevis</i>)	Formam canais iônicos que aumentam a permeabilidade da membrana celular bacteriana
Bacitracina	1945/1948	Bacitracina A (<i>Bacillus subtilis</i>)	Síntese da parede celular: inibição da desfosforilação de C 55 -isoprenil pirofosfato
Polimixinas	1950/1959	Colistina (<i>Paenibacillus polymyxa</i>)	Parede celular: ruptura da membrana celular
Mupirocina	1971/1985	Mupirocina (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	Síntese de proteínas: isoleucil t-RNA sintetase
Monobactâmicos	1981/1986	Aztreonam Molécula sintética baseada em SQ 26.180 (<i>Chromobacterium violaceum</i>)	Síntese da parede celular: proteínas de ligação à penicilina
Antibióticos de fungos			
Penicilinas	1929/1943	Amoxicilina Derivado semi-sintético da penicilina (<i>Penicillium chrysogenum</i>)	Síntese da parede celular: proteínas de ligação à penicilina
Ácido fusídico	1958/1962	Ácido fusídico (<i>Fusidium coccineum</i>)	Síntese de proteínas: fator de alongamento G
Enniatinas (c)	1953/1963	Fusafungina (<i>Fusarium lateritium</i>)	Parede celular: ruptura da membrana celular
Cefalosporinas	1948/1964	Cefacetila Derivado semi-sintético da cefalosporina C (<i>Acremonium chrysogenum</i>)	Síntese da parede celular: proteínas de ligação à penicilina
Pleuromutilinas	1951/2007	Retapamulina Derivado semi-sintético da pleuromutilina (<i>Pleurotus mutilus</i>)	Síntese de proteínas: subunidade ribossômica 50S

Continuação da Tabela 1

Classe (a)	Descoberta(b)/ Uso	Exemplo	Alvo molecular
Antibióticos sintéticos			
Arsfenaminas (d)	1907/ 1910	Salvarsan	Não conhecido
Sulfonamidas	1932/1936	Mafenide	Síntese de folato: inibição da dihidropteroato sintetase
Salicilatos (e)	1902/1943	Ácido 4-aminossalicílico	Síntese de folato: pró-droga que inibe a diidrofolato redutase
Sulfonas	1908/1945	Dapsona	Síntese de folato: inibição da dihidropteroato sintetase
Piridinamidas	1952/1952	Isoniazida	Parede celular: pró-droga que inibe a síntese de ácidos micólicos
Nitrofuranos	1945/1953	Nitrofurantoína	Síntese de DNA: danos no DNA
Azólicos (f)	1959/1960	Metronidazol	Síntese de DNA: danos no DNA
(Fluoro)quinolonas	1962/1962	Ciprofloxacina	Síntese de DNA: inibição da DNA girase e topoisomerase IV
Diaminopirimidinas	1950/1962	Trimetroprim	Síntese de folato: inibição da diidrofolato redutase
Etambutol	1962/1962	Etambutol	Parede celular: inibição da arabinosil transferase
Tioamidas	1956/1965	Etionamida	Parede celular: pró-droga que inibe a síntese de ácidos micólicos
Fenazinas (f)	1954/1969	Clofazimina	Síntese de DNA: liga-se a bases guanina
Oxazolidinonas	1987/2000	Linezolida	Síntese de proteínas: subunidade ribossômica 50S
Diarylquinolinas	2004/2012	Bedaquilina	Síntese de ATP: inibição da bomba de prótons

1.2.2- Mecanismos de ação

No geral os antibióticos atuam alterando as funções vitais dos microrganismos, tendo cada classe um mecanismo de ação diferente para matar ou inibir o crescimento das bactérias (Abushaheen *et al.*, 2020). Os mecanismos de ação das diversas classes de antibióticos são: interferir na síntese da parede celular; inibir a síntese de proteínas; inibir a síntese de ácido nucleico; inibir as vias metabólicas/enzimas bacterianas e interromper a estrutura da membrana bacteriana (Abushaheen *et al.*, 2020).

Os antibióticos β -lactâmicos, como as penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos contêm um anel β -lactâmico e o mecanismo de ação é inibir a última etapa da síntese de peptidoglicano da parede celular bacteriana (Eyler e Shvets, 2019). A parede celular é muito importante para a manutenção da forma da célula bacteriana, bem

como na proteção contra a lise da bactéria, fazendo a regulação osmótica. Sendo a parede celular o alvo de vários antibióticos, como os β -lactâmicos, por exemplo: penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, monobactâmicos e os glicopeptídeos, como: vancomicina e teicoplanina (Abushaheen *et al.*, 2020).

Alguns antibióticos atuam na síntese de proteínas, que é uma função vital para as bactérias, este método pode ser utilizado devido a diferença entre a estrutura dos ribossomos bacteriano e eucariótico, podendo então agir seletivamente nas bactérias. Podem atuar dificultando o processo na subunidade 30S (macrolídeos, aminoglicosídeos e tetraciclina) e 50S (cloranfenicol), interrompendo o crescimento da célula (Abushaheen *et al.*, 2020). Outro mecanismo de ação utilizado por antibióticos, é inibir a síntese de ácido nucleico. Este é o caso das fluoroquinolonas, que podem ser usadas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo bactérias anaeróbicas. Elas atuam inibindo a DNA girase em bactérias Gram-negativas, que é uma enzima fundamental na replicação do DNA. Já nas bactérias Gram-positivas, elas atuam inibindo a enzima topoisomerase IV, que tem papel na segregação do DNA durante a divisão celular. Já as quinolonas se ligam à topoisomerase IV ou II a alteram o superenrolamento do DNA, causando a morte celular. Alguns antibióticos podem atuar inibindo enzimas bacterianas ou inibindo vias metabólicas, como a via biossintética do folato. As sulfonamidas atuam como substrato alternativo ao ácido para-aminobenzóico (PABA) que participa da via de folato, sendo assim, as sulfonamidas atuam competindo com o PABA e inibindo a via, consequentemente inibindo o crescimento bacteriano. As sulfonamida e trimetoprima são antibióticos de amplo espectro, atuando sobre as bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae* e bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli*, algumas espécies do gênero *Shigella* e *Proteus mirabilis*. Também existem antibióticos que possuem moléculas carregadas positivamente e que conseguem atrair as bactérias que são carregadas negativamente, devido aos peptidoglicano e lipopolissacarídeos (LPS) na membrana externa. Sendo assim, as moléculas da polimixinas se ligam à membrana da bactéria, alteram a estrutura e causam um desequilíbrio osmótico, levando à morte celular (Abushaheen *et al.*, 2020).

A Figura 2 apresenta os mecanismos de ação das classes de antibióticos para inibir/ matar bactérias.

MECANISMO DE AÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS

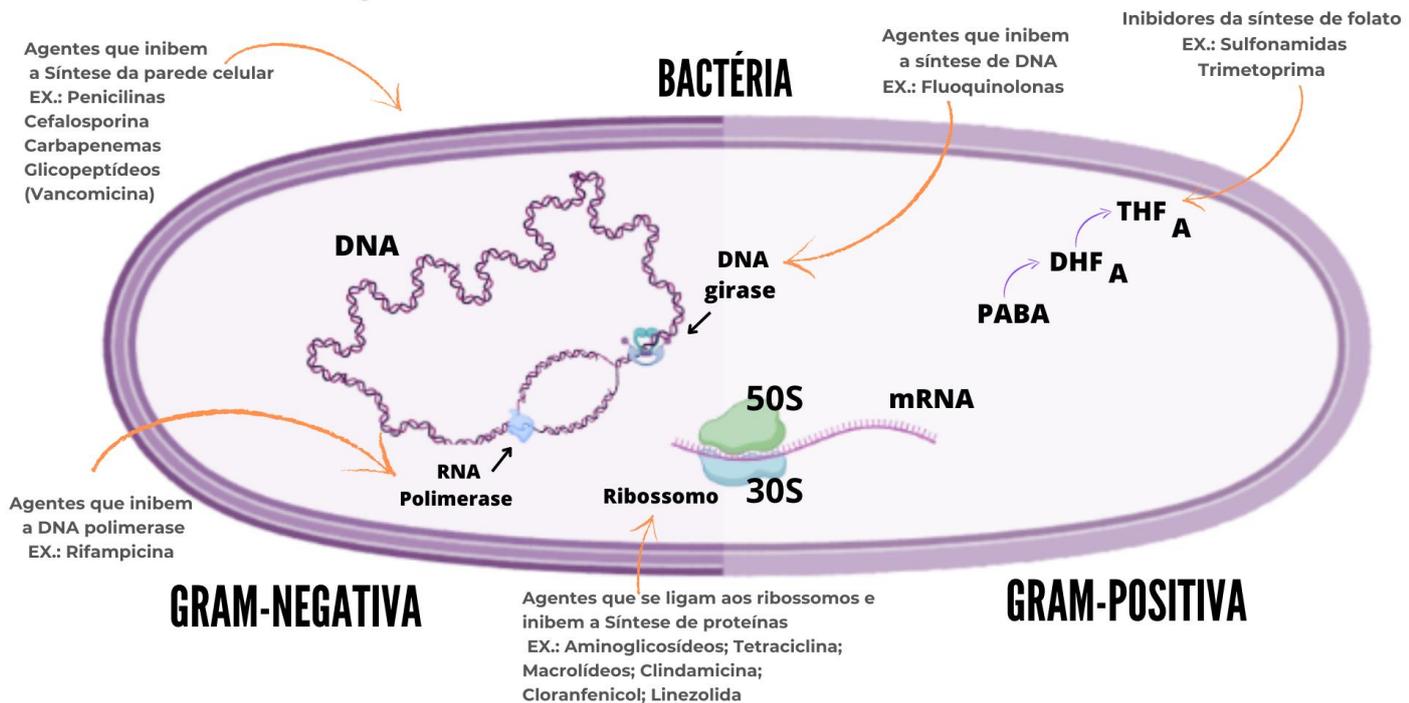


Figura 2: Mecanismos de ação das classes de antibióticos para inibir/ matar bactérias.

Fonte: Autoria própria, utilizando os programas BioRender.com e Canva.

1.2.3- Resistência bacteriana aos antibióticos

Muitas bactérias conseguem driblar os mecanismos de ação dos antibióticos e com isso, resistem à presença dessas substâncias, causando severos danos na sociedade (Anuj *et al.*, 2019). A resistência bacteriana é considerada um problema de saúde pública, quanto mais os antibióticos são utilizados de forma inadequada, maiores são as chances de as bactérias desenvolverem resistência (Abushaheen *et al.*, 2020). Há uma estimativa de que cerca de 10 milhões de pessoas morrerão por ano até 2050, devido a infecções causadas por bactérias resistentes aos antibióticos disponíveis (O'Neill, 2014).

As resistências podem ser classificadas como: resistência intrínseca aos antibióticos, que é um mecanismo de resistência endógena e a resistência aos antibióticos adquirida, que é proveniente de uma mutação ou recebida por algum mecanismo de

transferência gênica e que podem passar de uma bactéria para outra. As resistências intrínsecas podem se dar devido a três fatores: a permeabilidade da membrana externa celular, pois quando está diminuída, o metabolismo da bactéria é afetado e com isso ela absorve menos o fármaco (Anuj *et al.*, 2019); o sistema de efluxo ativo de bactérias, que possuem proteínas de bombeamento multidrogas presentes na membrana celular, bombeando o fármaco para fora da célula; a produção de enzimas específicas, como a β -lactamase, confere resistência à penicilina. Já a resistência à antibióticos adquirida pode ocorrer devido à resistência por mutações, como a mutação que altera a DNA girase alvo ou que reduzem as proteínas de membrana externa, diminuindo a quantidade de drogas que atravessam a superfície celular (Kime *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2020); aquisição de genes de resistência, por meio da transdução, da transformação ou conjugação que permite a aquisição de novos genes (Foster, 2017); resistência mediada por biofilme, devido a este formar uma matriz polimérica extracelular altamente hidratada que confere proteção (Craft *et al.*, 2019; Saxena *et al.*, 2019). Os mecanismos de resistência das bactérias aos antimicrobianos são: a inativação do antibiótico com a produção de enzimas, como as beta-lactamases; alterações do sítio alvo do antibiótico; uso de vias metabólicas alternativas, bombas de efluxo e alterações à permeabilidade da célula ao antibiótico (Cabral, 2012; Marinho *et al.*, 2016).

A presença de antibióticos em alguns ambientes, como por exemplo, devido ao descarte inadequado desses antimicrobianos em ambientes aquáticos, podem contribuir para que ocorra uma pressão seletiva de mutantes resistentes dessas estirpes bacterianas. Os antibióticos também podem contaminar as águas subterrâneas e conseqüentemente chegar à água potável e assim para seus consumidores (Vaz-Moreira *et al.*, 2011). Uma vez selecionados mutantes resistentes, podem transferir estes genes para estirpes patogênicas para o homem e para animais. Um fator também preocupante é quando ocorre a presença das bactérias patogênicas resistentes nas fezes que acabam por poluir o ambiente aquático, que pode então representar um veículo de contaminação de peixes e outros organismos aquáticos (Hatha *et al.*, 2005).

Uma das principais espécies patogênicas resistentes é a bactéria Gram-positiva, *Staphylococcus aureus*, a qual pode ser residente natural da microbiota humana, porém em determinadas circunstâncias pode adquirir virulência causando uma série de doenças infecciosas, como: doenças de pele, tecidos moles, endocardite, pneumonia, entre outras.

(Guo *et al.*, 2020). As bactérias da espécie *S. aureus* podem se tornar resistentes à meticilina, um antibiótico betalactâmico de pequeno espectro pertencente ao grupo das penicilinas, sendo assim, denominadas *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA). As bactérias MRSA são de difícil tratamento e devido a evolução das bactérias e uso indiscriminado dos antimicrobianos, essas bactérias estão aumentando a taxa de infecção em humanos (Guo *et al.*, 2020). A resistência ocorre devido à mutação do gene *mecA* que passa a codificar a enzima PBP2a, capaz de degradar o anel β -lactâmico (Schulte e Munson, 2019).

Na figura 3, retirada do artigo de Lai *et al.*, 2022, pode-se observar de uma forma geral os mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos. Sendo assim, o número 1 representa as enzimas que os inativam pela modificação da sua estrutura química; O número 2 representa o mecanismo de resistência que diminui as concentrações de antibióticos intracelulares, (2a.) reduzindo/perdendo porinas, assim consegue evitar que o antibiótico entre na célula, (2b.) através de bombas de efluxo, que expulsam o antibiótico da célula. O número 3 representa o mecanismo que altera os sítios alvos dos antibióticos, que normalmente são: (3a.) ribossomos, (3b.) enzimas de replicação do DNA e precursores da parede celular. O número 4 está referenciando o mecanismo de proteção do sítio-alvo do antibiótico, como no caso da modificação da carga da superfície bacteriana LPS – Lipopolissacarídeo ou peptidoglicano.

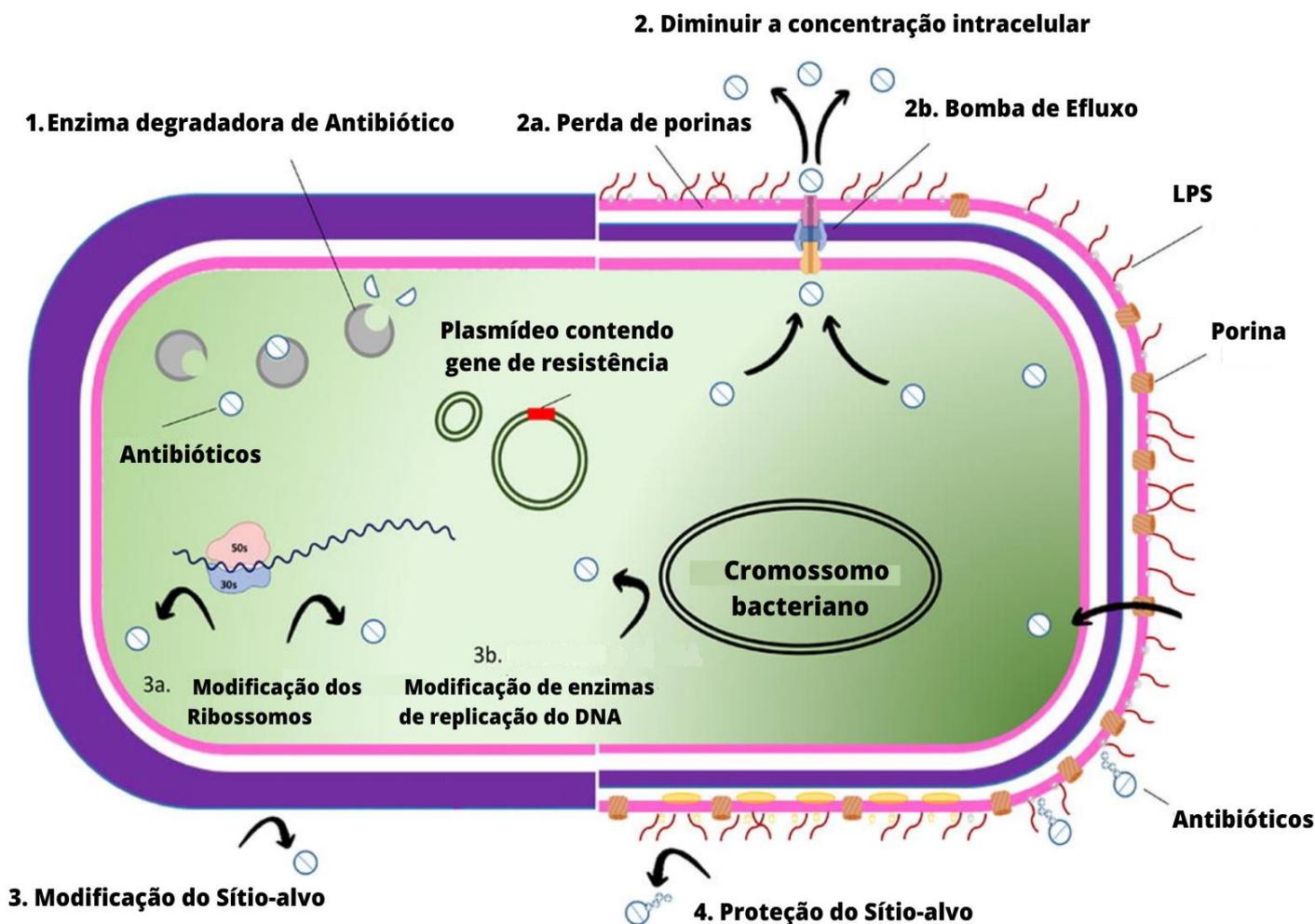


Figura 3: Principais mecanismos de resistência bacteriana. São apresentadas as diferenças entre as estruturas/composição da parede celular das bactérias Gram-positivas, no lado esquerdo, e das Gram-negativas, no lado direito. Figura adaptada do artigo de Lai *et al.*, 2022.

1.3 - Bacteriocinas

As bacteriocinas já são consumidas há milênios, por meio de alimentos fermentados, em que bactérias iniciadoras do processo fermentativo são produtoras de bacteriocinas, sendo um antimicrobiano natural. Atualmente, tem sido estudada para a descoberta de novos bioconservantes e diversas outras aplicações (O'Connor *et al.*, 2020). A primeira bacteriocina foi descrita na literatura em 1925 por Gratia, o qual descreveu o antagonismo entre estirpes de *Escherichia coli* (Gratia, 1925; Gillor, Giladi & Riley,

2009). Bacteriocinas são proteínas ativas sintetizadas a nível dos ribossomos com peso molecular que podem variar, como por exemplo de 2 a 30 kDa. Possuem características anfipática e catiônica, as quais permitem a interação com as membranas das bactérias, podendo causar desestabilidade na membrana por meio da formação de poros (Bahar & Ren, 2013). Podem ser excretadas tanto por bactérias Gram-positivas, quanto por bactérias Gram-negativas. Esses peptídeos antimicrobianos são capazes de inibir o crescimento ou matar outros microrganismos, sendo as bactérias produtoras imunes a esta substância (Mahlapuu *et al.*, 2016). A produção de bacteriocinas tem um custo metabólico, sendo assim, para ser vantajoso para a bactéria produtora, os benefícios devem ser maiores que este custo. Como benefícios as bacteriocinas devem poupar as estirpes bacterianas que possuem relação mutualista com a produtora, como também os microrganismos alvos não podem adquirir resistência a elas (Heilbronner *et al.*, 2021). Com isso, apresentam um menor espectro de atividade, sendo mais precisa do que a maioria dos antibióticos (Madigan *et al.*, 2004; Heilbronner *et al.*, 2021), podendo ser usadas como agentes terapêuticos contra microrganismos patogênicos (Riley & Wertz, 2002).

A investigação de novas substâncias antimicrobianas é de grande importância para a obtenção de novas opções de tratamento de infecções causadas por bactérias, haja visto o problema de resistência bacteriana aos antibióticos. É também de grande valor biotecnológico a descoberta de novos conservantes, que possam ser utilizados nas indústrias de alimentos e de cosméticos. As bacteriocinas oriundas de bactérias Gram-positivas são mais exploradas por serem produzidas por bactérias do ácido-láctico. Essas bacteriocinas são consideradas mais seguras, devido às bactérias produtoras já serem encontradas em alimentos. Assim, essas bacteriocinas possuem o *status* de “Geralmente Reconhecida Como Seguras” GRAS (do inglês, *Generally Recognized As Safe*), podendo ser consumidas sem causar danos à saúde humana. Exemplos de bacteriocinas que são utilizadas como conservantes nas indústrias alimentícias são a nisina e a pediocina (Sarkar *et al.*, 2017; Sulthana & Archer, 2021).

A bacteriocina nisina foi descoberta em 1928, originalmente produzida pela bactéria Gram-positiva *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, tendo atividade antimicrobiana contra a bactéria da espécie *Lactococcus bulgaricus* (Balciunas *et al.*, 2013). Atualmente é utilizada mundialmente como conservante alimentício contra bactérias deterioradoras de alimentos, possui um amplo espectro de ação, podendo combater bactérias dos

gêneros: *Lactococcus*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, entre outros (Hurst, 1981). A pediocina é a bacteriocina produzida por estirpes do gênero *Pediococcus* que possui alta atividade contra bactérias do gênero *Listeria* e *Enterococcus* (Balandin *et al.*, 2019). A pediocina PA-1, comercializada como Alta™ 2341, é produzida por bactérias da espécie *Pediococcus acidilactici* e inibe em particular a bactéria *Listeria monocytogenes*, promovendo o prolongamento da vida útil dos alimentos (Kumariya *et al.*, 2019). Outra bacteriocina é a zoocina, que é uma bacteriocina produzida por estirpes da espécie *Streptococcus equi* subsp. *zoepidermicus*, uma Zn-metaloprotease da família M23/M37. Com função de enzibiótico com atividade contra bactérias Gram-positivas, clivando os peptídeos da parede celular (Chen *et al.*, 2013).

Diversas bactérias têm sido descritas como produtoras de bacteriocinas ou substâncias semelhantes a estas. Como exemplo, temos a *E. coli* produtora de colicina (Gillor *et al.*, 2008; Bayramoglu *et al.*, 2017) e também os gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*, que produzem as estafilococcinas e estreptococcinas, respectivamente (Armstrong *et al.*, 2016). Substâncias antimicrobianas semelhantes à bacteriocinas também foram descritas em *Aeromonas* sp. (Messi *et al.*, 2003).

As bacteriocinas apresentam diversas vantagens, possuem baixa toxicidade em células eucarióticas; conseguem inibir o crescimento de algumas estirpes bacterianas com baixo valor de concentração inibitória mínima (MIC); toleram altas temperaturas; algumas bacteriocinas podem apresentar um amplo espectro de ação (Radic *et al.*, 2020; Sulthana & Archer, 2021), porém geralmente são espécies específicas, apresentando ação contra um grupo específico de microrganismo, filogeneticamente próximos, podendo ser utilizado para combater infecções sem afetar as bactérias naturalmente presentes no organismo (Ghosh *et al.*, 2019). Já algumas desvantagens e limitações do uso das bacteriocinas são: necessidade de utilizar alta dose para ter o efeito esperado e sensibilidade a enzimas proteolíticas (Sulthana & Archer, 2021). Para o sucesso do uso das bacteriocinas e sua aplicabilidade no mercado, há a necessidade de responder a seis pilares principais: o espectro de ação (amplo ou estreito); a estabilidade em relação a temperatura e pH; a bioengenharia (se são bioflexíveis); a diversidade molecular; a produção (método tradicional de fermentação descontínua, síntese química para alto nível de produção, mimetizando a molécula) e a segurança (citotoxicidade) (Hols *et al.*, 2019).

Em relação a resistências, podem ser utilizadas combinações de bacteriocinas com diferentes mecanismos de ação, fazendo uma abordagem de barreira, aumentando o efeito

da bacteriocina, como também reduzindo a possibilidade de selecionar estirpes resistentes (O'Connor *et al.*, 2020). Ao atacar vários alvos moleculares a probabilidade de desenvolver resistências à substância é muito menor (Cao *et al.*, 2020).

1.3.1 Classificação das bacteriocinas

Ao longo do tempo, diversas classificações foram propostas para as bacteriocinas, sendo a classificação que divide em dois grandes grupos a mais clara e selecionada para este trabalho. As bacteriocinas são divididas em dois grandes grupos, as bacteriocinas oriundas de bactérias Gram-positivas e as bacteriocinas oriundas de bactérias Gram-negativas. São classificadas de acordo com as propriedades físico-químicas.

As bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas, são divididas em três classes: a classe I é conhecida por conter bacteriocinas com baixo peso molecular, sendo menor que 10 kDa e sofrem modificações enzimáticas durante a biossíntese. São peptídeos lineares ou globulares modificados pós-tradução, contendo lantionina, β -metil lantionina e aminoácidos desidratados. Exemplo destas bacteriocinas são: nisina A, U e Z, mersacidina, labirintopetina A2, subtilosina A. Algumas bacteriocinas da classe I podem ser classificadas como lantibióticos, pois podem conter lantionina e β -metil lantionina, que são aminoácidos modificados em sua composição (Cotter *et al.*, 2005, Drider & Rebuffat, 2011).

As bacteriocinas de classe II também são pequenas e não sofrem mudanças enzimáticas para a realização de sua função, não contém lantionina e são uma classe heterogênea. Essa classe é subdividida em classe IIa, IIb, IIc e IId. Sendo a classe IIa as bacteriocinas semelhantes a pediocina PA-1, como exemplo: pediocina PA-1 e carnobacteriocina X; a classe IIb são as bacteriocinas compostas por dois peptídeos. Como as, lactacina F e ABP-118; a classe IIc são compostas por peptídeos circulares, por exemplo: carnociclina A e enterocina AS-48. Já as da classe IId são compostas por peptídeos lineares não-pediocina-like e peptídeo único. Por exemplo, temos a epidermicina NI01 e a lactococina A. As bacteriocinas de classes I e II são termoestáveis e são as classes mais estudadas (Yang *et al.*, 2014; Alvarez-Sieiro, 2016).

As bacteriocinas de classe III são peptídeos grandes, maiores que 10 kDa e são termolábeis, podem ter associação com fosfolipídios e carboidratos (Klaenhammer, 1993; Drider & Rebuffat, 2011). Exemplo de bacteriocinas da classe III são: caseicina 80, enterolisina A e helveticina J (Cotter *et al.*, 2005, Drider & Rebuffat, 2011).

Já as bacteriocinas oriundas de bactérias Gram-negativas podem ser classificadas em dois grandes grupos: as colicinas e as microcinas.

As colicinas são bacteriocinas com atividade contra bactérias intimamente relacionadas, já que permitem eliminar os competidores ambientais e conseguir espaço e nutriente. Possuem três domínios: o domínio T de translocação amino-terminal que está relacionado à exportação da bacteriocina pela membrana através da proteína translocadora; o domínio R que é o domínio central de ligação ao receptor, no qual tem a sequência de ligação a um receptor de membrana externa, e o domínio C que é o carboxi-terminal, um domínio citotóxico com atividade antibacteriana. As bactérias produtoras de bacteriocinas produzem também uma proteína de imunidade específica que atua inativando a bacteriocina. As estirpes sensíveis possuem uma proteína receptora e translocadora que reconhece a bacteriocina e a transporta para dentro da célula, onde conseguirá exercer sua atividade bactericida ou bacteriostática. As estirpes resistentes não possuem essa proteína receptora, já as estirpes tolerantes possuem uma deficiência no sistema de proteínas translocadoras (Yang *et al.*, 2014). As colicinas podem ser encontradas em plasmídeos e algumas podem estar presentes no cromossomo da bactéria. As bactérias produtoras de colicinas, possuem um agrupamento gênico, codificando a proteína estrutural de toxina, a proteína de imunidade e a proteína de lise (proteína de liberação de bacteriocina – BRP, do inglês *Bacteriocin Release Protein*). As colicinas possuem três mecanismos de ação: atuam na formação de poros na membrana; apresentam atividade enzimática como DNase e RNase que digerem o material genético e podem digerir os precursores de peptideoglicano, interrompendo a síntese. Existem subcategorias para a classe das colicinas, de acordo com o mecanismo de exportação da bacteriocina.

As colicinas podem ser classificadas em 2 grupos de acordo com o sistema de translocação: o grupo A e B. O grupo A tem o transporte da bacteriocina pelo sistema Tol presente na membrana externa das bactérias, como as colicinas E1, E9, A, K e N. Essas colicinas geralmente são codificadas por plasmídeos pequenos associados a genes de lise. Já as colicinas do grupo B são transportadas pelo sistema Ton, geralmente são codificadas por plasmídeos grandes e não possuem associação com genes de lise. Exemplos dessas colicinas são: colicina 5, 10, B, D, M, V, Ia, Ib (Kleanthous, 2010; Yang *et al.*, 2014). Outra classificação das colicinas baseia-se no mecanismo de ação, podendo ser

classificadas em três tipos: colicinas formadoras de poros, que podem formar canais na membrana interna, causando o extravasamento dos componentes citoplasmáticos e consequentemente destroem o gradiente eletroquímico, levando a morte celular. Exemplo dessas colicinas são as: A, B, E1, Ia, Ib, K e N. O segundo grupo é conhecido por colicinas do tipo nuclease, que podem digerir o DNA/RNA, por meio das enzimas DNase, 16S rRNase e tRNase. Como exemplo temos as colicinas E2 a E9. No terceiro grupo estão as colicinas do tipo peptidoglicanase, as quais incapacitam a célula de produzir peptidoglicano, devido a digestão do precursor do peptidoglicano (Cascales *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2014).

Diferentemente das colicinas que possuem um peso molecular mais alto, em torno de 25-80 kDa, as microcinas possuem peso molecular baixo, em torno de 10 kDa. São peptídeos hidrofóbicos e são produzidos como peptídeos precursores, incluindo peptídeos centrais e N-terminal, podendo sofrer modificações pós-traducionais ao sofrer maturação para microcina ativa. Resistem ao calor, pH e a proteases. O sistema de secreção utilizado para exportar as microcinas é o sistema de secreção de transporte ABC tipo I (Duquesne *et al.*, 2007; Rebuffat, 2012; Yang *et al.*, 2014). As microcinas são divididas em 4 classes: I, II, IIa e IIb. A classe I é composta por peptídeos de baixo peso molecular, menores que 5 kDa e sofrem modificação pós-tradução. Exemplo destas bacteriocinas são: B17, C7/C51, D93 e J25. As microcinas de classe II são peptídeos maiores entre 5 a 10 kDa, podendo sofrer modificação pós-tradução ou não. As microcinas de classe IIa necessitam de mais de um gene para sintetizar os peptídeos funcionais. Exemplo de microcinas de classe IIa são: I, V e N/24. Já as microcinas de classe IIb são peptídeos lineares com modificações pós-traducionais. Como exemplo temos as: microcina E492, M e H47 (Severinov *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2014).

1.3.2 Mecanismo de ação

Assim como os antibióticos, as bacteriocinas também possuem diversos mecanismos de ação para matar ou inibir o crescimento das bactérias. Sendo eles: ação na síntese da parede celular, inibição da replicação do DNA, interferência na síntese de proteínas e rompimento da estrutura da membrana e formação de poros.

A nisina, bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis*, é um exemplo de bacteriocina com ação na síntese da parede celular. Utilizam o mecanismo bacteriostático

quando se ancoram ao lipídio II na membrana, que é um precursor do polissacarídeo peptidoglicano, da síntese da parede celular. Ou efeito bactericida, quando está em alta concentração, criando poros na membrana e levando a morte celular. Atua contra bactérias Gram-positivas, sendo muito útil na indústria alimentícia e farmacêutica.

As bacteriocinas também podem atuar inibindo a síntese de DNA, atuando sobre a girase, este mecanismo não representa empecilho para a sua aplicação biotecnológica, graças às diferenças entre a DNA girase bacteriana e humana (Sulthana & Archer, 2021). Um exemplo é a microcina B17. As colinas E3-E6 e cloacina DF13, por exemplo, apresentam atividades da rRNase. As bacteriocinas colicinas do tipo E, possuem atividade de endonuclease e inibem a tradução agindo na extremidade 3', da sequência de codificação e clivando 16S rRNA. Colicinas do tipo D e E5 são tRNases agindo sob a exaustão de tRNA que resulta em síntese proteica limitada (Sulthana & Archer, 2021). Algumas bacteriocinas podem causar a ruptura da integridade da membrana, formando poros e causando vazamento de material celular, pois se acoplam ao local do lipídio II. Exemplos de bacteriocinas com esse mecanismo de ação são a nisina, Bac-GM17, PlnJ/K, PlnE/F, Pep5, I e epidermina. A bacteriocina lacticina Q, utiliza o movimento *flip-flop* dos lipídeos, para formar poros e levar a morte celular, já a carnociclina A se associa diretamente a camada lipídica e formam os poros. O mecanismo de ação mais inovador das bacteriocinas é a formação de septo durante a mitose, interrompendo o ciclo celular e assim, inativando a bactéria alvo (Sulthana & Archer, 2021). A figura 4 apresenta os mecanismos de ação das bacteriocinas nas células alvo.

MECANISMO DE AÇÃO DAS BACTERIOCINAS

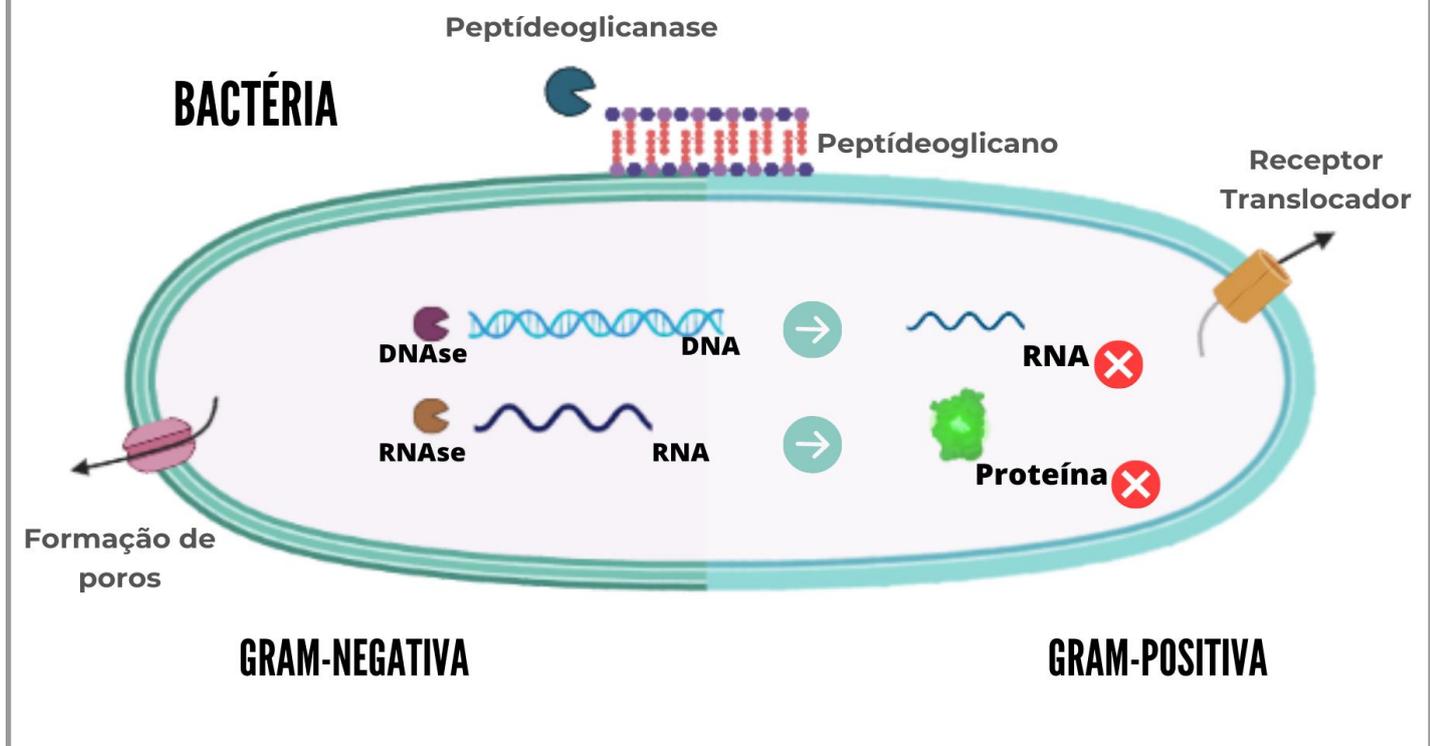


Figura 4: Mecanismo de ação das bacteriocinas nas células alvo. Fonte: Autoria própria, através das ferramentas BioRender.com e Canva.

1.3.3 Aplicação biotecnológica

Atualmente as bacteriocinas são conhecidas por sua aplicação como conservantes alimentícios, fazendo o controle de microrganismos deterioradores. Devido à grande crise global gerada pela presença de bactérias resistentes aos antibióticos disponíveis no mercado farmacêutico, houve a necessidade de explorar novas vertentes de estudo para fazer o controle desses patógenos multirresistentes. Com isso, os pesquisadores tiveram um novo olhar sobre as bacteriocinas. Com o avanço das pesquisas e das tecnologias foi possível descobrir diversas aplicações para essas substâncias.

Há também uma crescente busca por conservantes mais naturais que possam conferir maior durabilidade e aproveitamento para os alimentos, pois os consumidores estão cada vez mais conscientes e exigentes em relação à qualidade de vida, buscando alimentos mais saudáveis. Sendo necessário reduzir os aditivos químicos e trocá-los por

conservantes naturais como as bacteriocinas. A bacteriocina nisina, produzida pela bactéria *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, já vem sendo utilizada no processo de conservação de alimentos em diversos países (Cotter *et al.*, 2005; Sarkar *et al.*, 2017). Podem ser utilizadas nas rações de animais, como aditivo, para evitar danos causados por patógenos (Yang *et al.* 2014).

Além do uso como conservantes, existem pesquisas que apresentam o uso clínico das bacteriocinas, para inibir patógenos multirresistentes a drogas, substituindo os antibióticos (Yang *et al.* 2014), evitando diversas mortes humanas por falta de medicamentos eficazes para combater infecções bacterianas. Também há relatos de uso médico para o tratamento de câncer (Lancaster *et al.*, 2007; Yang *et al.* 2014). Ainda na área da saúde, bactérias produtoras de bacteriocinas podem ser utilizadas em probióticos, evitando doenças gastrointestinais através do equilíbrio das bactérias no trato digestivo (Yang *et al.* 2014).

As substâncias antimicrobianas também podem ter aplicabilidade na aquicultura, usando as bactérias produtoras como probióticos, prevenindo infecções de peixes e de outros animais marinhos como camarões e lagostas, infecções estas responsáveis por grandes perdas econômicas (Dugenci & Candan, 2003; Pond *et al.*, 2006; Nguyen *et al.*, 2014).

A Figura 5 apresenta a linha do tempo das aplicações das bacteriocinas para tratamentos em alimentos e na área da saúde humana. A parte verde representa as aplicações de bacteriocinas já alcançadas. Já a parte vermelha representa as possíveis aplicações das bacteriocinas no futuro. Durante 70 anos, as bacteriocinas vem sendo utilizadas em probióticos (com produtores de bacteriocinas vivos) e como mono tratamentos (apenas as bacteriocinas), sendo usadas na conservação de alimentos e equilíbrio da microbiota no trato digestivo de humanos. Futuramente as bacteriocinas, isoladas ou em formas de coquetéis, podem ser utilizadas para tratar infecções por bactérias multirresistentes e distúrbios da microbiota. O uso veterinário ou como esterilizante de materiais hospitalares e nas indústrias de alimentos também são campos de aplicações de bacteriocinas. Também poderá ser utilizada na prevenção da disbiose sistêmica, através do equilíbrio dos microrganismos, mobilizando as populações endógenas da microbiota através de moléculas indutoras (Hols *et al.*, 2019).

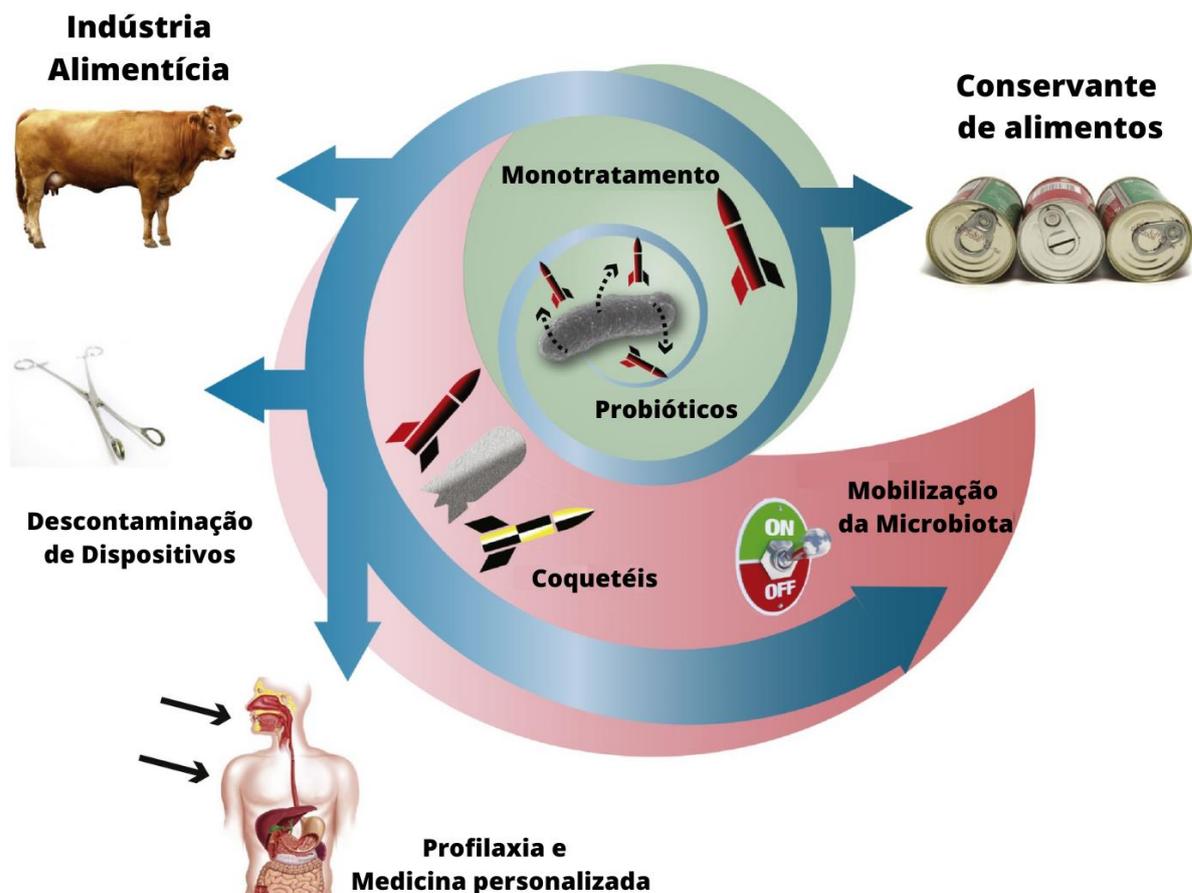


Figura 5: Aplicações biotecnológicas das bacteriocinas em tratamentos aplicados para alimentação e saúde humana. O círculo verde representa os tratamentos já aplicados e a parte vermelha representa as possíveis aplicações das bacteriocinas no futuro. Figura adaptada do artigo Hols e colaboradores (2019).

1.4 - Bactérias produtoras de substâncias antimicrobianas e o ambiente aquático

Na literatura, há relatos de diversos gêneros de bactérias capazes de produzir substâncias antimicrobianas, tanto entre as bactérias Gram-positivas, como entre as Gram-negativas. É estimado que mais da metade das espécies sejam capazes de produzir compostos com atividade antimicrobiana, como as bacteriocinas, as quais lhes conferem vantagens competitivas em seus nichos ecológicos (Perez, Zendo & Sonomoto, 2022). As bactérias produtoras podem ser encontradas em diversos ambientes: terrestres, como no solo, aquáticos, como em mares e rios, como também podem ser encontradas em animais.

É de conhecimento comum que o ambiente aquático possui uma biodiversidade vasta e que formam 70% da superfície do planeta Terra. Em relação aos microrganismos presentes nesse ambiente, existem diversos gêneros que devem ser estudados. Devido à alta biodiversidade presente, também há uma grande competição por nutrientes e espaço, fazendo com que esses microrganismos produzam substâncias bioativas. O ambiente marinho tem uma enorme diversidade e é considerado excelente para a bioprospecção de moléculas ativas (Stincone & Brandelli, 2020). Já existem relatos de estirpes isoladas de ambiente aquático produtoras de substâncias antimicrobianas. Alguns gêneros são comumente encontrados em peixes, como por exemplo, os gêneros *Pseudomonas*, *Vibrio* e *Aeromonas*.

As bactérias do filo Actinobacteria produzem diversos compostos bioativos. Dentre os 22.000 compostos produzidos por microrganismos e que são utilizados nas indústrias, na agricultura e na medicina, cerca de 45% são produzidos pelo filo actinobacteria. As bactérias do gênero *Micromonospora*, pertencentes a ordem actinomycetales (actinomicetos), são comumente encontradas em ambientes marinhos e foram relatadas como capazes de produzirem diversos compostos ativos. Um exemplo é a gentamicina, que é essencial para o uso na saúde. Outra substância com atividade produzida por este gênero é a tiocoralina, que é um metabólito secundário (Qi *et al.*, 2020). Nos últimos anos, o filo firmicutes foi o mais estudado em relação à produção de substâncias antimicrobianas no ambiente aquático. Mesmo que neste ambiente tenha um grande número de representantes do filo Actinobacteria, que já é conhecido por ser o filo com mais bactérias produtoras dessas substâncias. Isso pode ocorrer devido à dificuldade de cultivar as bactérias do filo Actinobacteria de sedimentos marinhos (Stincone & Brandelli, 2020). Dentre os gêneros que compõem o filo firmicutes, o gênero *Bacillus* é o mais explorado e já foi relatado como produtor de substâncias antimicrobianas. Nos últimos anos, foram relatadas fijimicinas isoladas de *Streptomyces* e linamicinas, ambas produzidas por bactérias do filo actinobacteria e a substância macrolactina oriunda de bactérias do gênero *Bacillus* (Stincone & Brandelli, 2020). Considerando a biodiversidade marinha, as bactérias mais abundantes são as α -proteobacteria, porém devido à dificuldade de seu cultivo, as bactérias mais cultivadas são do grupo das γ -proteobacteria. O filo das proteobacterias representam cerca de 50% - 80% das bactérias do ambiente marinho. Esse filo é composto por bactérias Gram-negativas que habitam

diversos ambientes. Os principais gêneros representantes desse grupo em ambiente marinho são: *Vibrio*, *Pseudoalteromonas* e *Pseudomonas* (Desriac *et al.*, 2013).

Ao analisar a produção de substâncias antimicrobianas, deve-se ter uma amostragem ampla, para verificar o número de estirpes produtoras e agrupamentos de genes biossintéticos (BGCs) corretos. Além disso, explorar ambientes ainda não explorados ou pouco explorados, como o ambiente marinho, possibilitará aumentar a quantidade de bactérias produtoras detectadas (Hutchings, Truman & Wilkinson, 2019). Um exemplo de organismo isolado de ambiente aquático contendo aplicações biotecnológicas é a bactéria do gênero *Salinospora* e pertencente ao filo actinobacteria. Estas bactérias foram referenciadas como produtora de múltiplos produtos naturais novos, como a salinosporamida A, que possui atividade anticancerígena (Hutchings, Truman & Wilkinson, 2019). O trabalho de Tracanna e colaboradores (2017), apresenta a grande diversidade de BGCs e a relação taxonômica entre os filos produtores, permitindo verificar como é distribuída a produção de substâncias antimicrobianas. A Figura 6 apresenta os *clusters* biossintéticos anotados pelo programa AntiSMASH + ClusterFinder e a sua relação taxonômica procariótica.

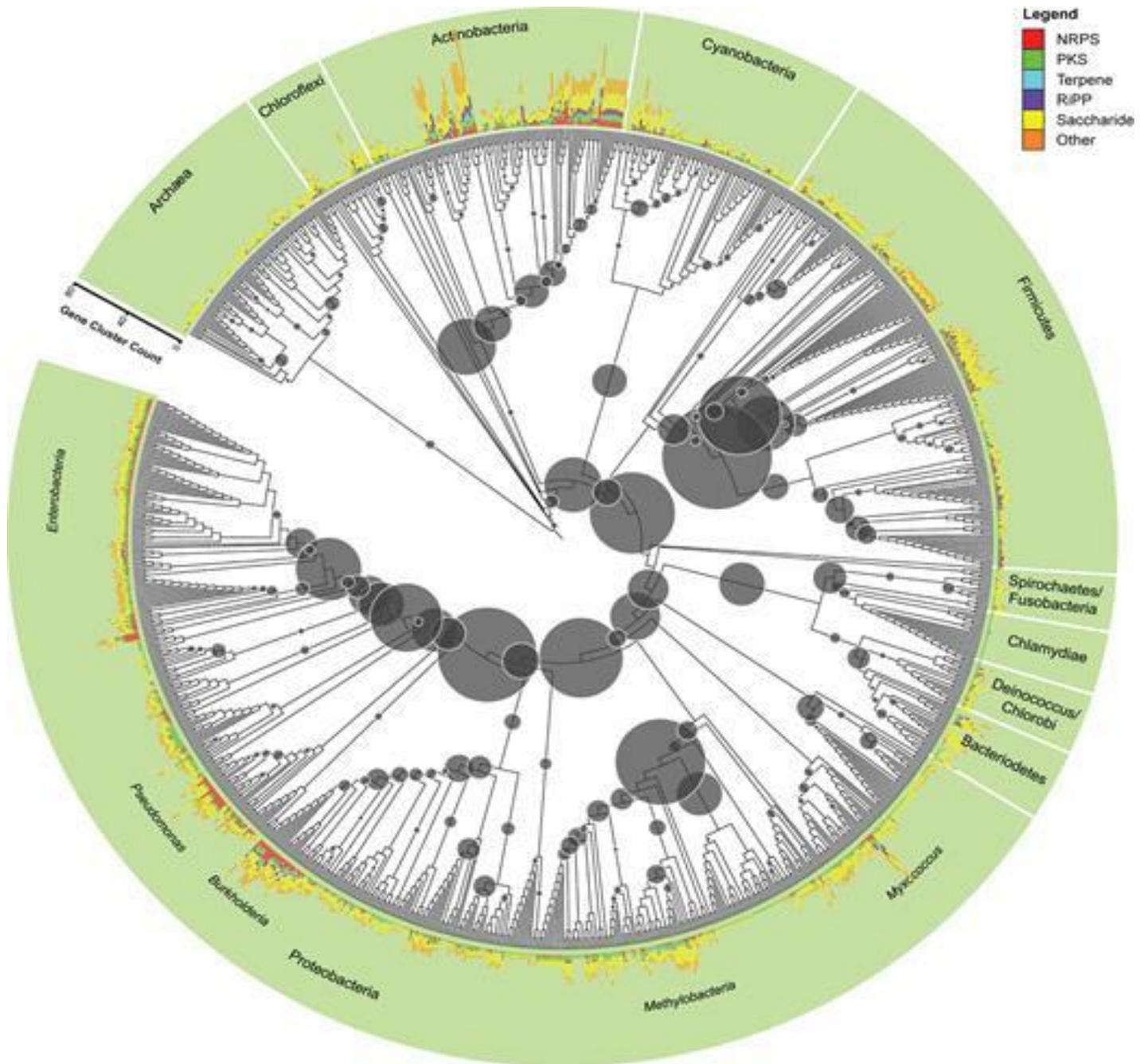


Figura 6: Diversidade taxonômica de agrupamentos de genes biossintéticos (BGCs) em filos de archaea e bactérias. Os BGCs foram anotados pela ferramenta AntiSMASH + ClusterFinder. Os filos estão representados pelo círculo externo (verde), as bactérias e as archaeas são representadas pela árvore, no qual os círculos (cinza) indicam quantidade de variação dentro do táxon. Os tipos de BGCs anotados foram diferenciados através da cor no gráfico de barra. Sendo as cores de cada BGCs apresentadas na legenda da figura. Fonte: Cimermanic *et al.*, 2014 adaptada e publicada por Tracanna *et al.*, 2017.

O gênero *Pseudomonas* já foi descrito em diversos trabalhos como produtor de substância antimicrobiana. Ahmad e colaboradores (2013) detectaram a produção de uma substância pela estirpe de *Pseudomonas putida* FStm2, isolada da pele de tubarão. A substância apresentou ampla atividade antimicrobiana contra diversos patógenos. A bactéria indicadora utilizada foi a *Serratia marcescens* ATCC 13880. A bacteriocina foi purificada por precipitação com sulfato de amônio e filtração em gel numa coluna Superdex-200. O peso molecular desta bacteriocina foi estimado em aproximadamente 32 kDa por meio de SDS-PAGE (Ahmad *et al.*, 2013). No trabalho de Ghrairi e colaboradores (2015), foram testadas estirpes do gênero *Pseudomonas* isoladas de água termal para verificar a produção de bacteriocinas. Foram testadas contra bactérias indicadoras de gêneros relacionados e também bactérias Gram-positivas. Com isso, pode-se verificar que as estirpes de *Pseudomonas putida* são capazes de produzir substância antimicrobiana que inibem estirpes de *Pseudomonas* e outros gêneros, incluindo patógenos de origem alimentar. A substância antimicrobiana produzida pela estirpe *Pseudomonas putida* T01 teve efeito bactericida para estirpe de *Escherichia coli*.

Um exemplo de bacteriocina produzida pelo gênero *Streptococcus* é a salivaricinas. No trabalho de Barbour & Philip (2014), foram relatadas novas estirpes de *Streptococcus salivarius*, isoladas da Malásia, com potencial probiótico. As estirpes possuem atividade antimicrobiana variável, sendo que a estirpe NU10 possui genes que codificam as salivaricinas A e 9 e a estirpe YU10 possui genes que codificam salivaricinas A3, G32, estreptina e slnA1, proteína semelhante ao grupo dos lantibióticos. Já a estirpe GT2 possui genes que codificam uma grande bacteriocina não-lantibiótica (salivaricina-MPS). O trabalho de Li e colaboradores (2014) detectou uma estirpe de *Streptococcus iniae* que produz uma bacteriocina putativa com 101 resíduos de aminoácidos, o alinhamento com uma lactococina 972 de *Lactococcus lactis* apresentou 35% de identidade. A bacteriocina foi nomeada de Sil e análise da técnica de imunoblot mostrou que a bacteriocina Sil foi secretada por *Streptococcus iniae* no meio extracelular. A bacteriocina Sil recombinante (rSil) inibiu o crescimento de *Bacillus subtilis*, mas não causou a morte e ao tratá-la com aquecimento a 50°C perdeu o efeito de inibição. Sendo assim, os autores afirmam que Sil tem efeito bacteriostático.

Outro trabalho relacionado com o ambiente aquático é o trabalho de Migaw e colaboradores (2014) que isolaram estirpes bacterianas de vísceras de peixes do Mediterrâneo, sendo nove estirpes de bactérias ácido lácticas com atividade antimicrobiana, semelhante à bacteriocina, contra *Listeria innocua*. As estirpes foram identificadas por meio do sequenciamento do gene que codifica o rRNA 16S, como: sete estirpes pertencem a espécie *Enterococcus durans*; uma é *Lactococcus lactis* e uma é *Enterococcus faecium*. Utilizando a técnica de PCR pode-se identificar o gene produtor de nisina no genoma de *L. lactis*; em *E. durans* GM19 foram encontrados genes que codificam enterocinas A e B; já em *E. faecium* foram encontrados genes que codificam enterocinas A, B e P. Foi realizada a técnica de espectrometria de massa por ionização eletropulverização na bacteriocina purificada produzida pela estirpe *E. durans* GMT18 e como resultado pode-se observar que a massa molecular exata foi de 6.316,89 Da, e esta bacteriocina foi nomeada de durancina GMT18.

Nguyen e colaboradores (2014) afirmam que as bacteriocinas podem ser encontradas em diversas espécies bacterianas, tanto as bactérias de ambiente terrestre como também de ambiente aquático. Os autores isolaram bactérias de animais marinhos de interesse na aquicultura, para buscar bactérias com atividades antimicrobianas, buscando a biodiversidade das bacteriocinas e futuras aplicações na aquicultura. Dentre os 100 isolados, 24 apresentaram atividades antimicrobianas e a identificação das estirpes foi realizada pelo uso do sequenciamento do gene que codifica o rRNA 16S. Foram encontrados os gêneros: *Proteus*, *Providencia*, *Klebsiella*, *Alcaligenes*, *Bacillus* e *Enterococcus*. Sete isolados bacteriocinogênicos apresentaram um amplo espectro antimicrobiano contra patógenos de origens alimentares e animais, sendo sugerido o seu uso como probióticos em alimentos, na aquicultura, na veterinária e na clínica. Foi criada uma preparação probiótica da estirpe *Bacillus pumilus* B3.10.2B para ser utilizada em lagostas juvenis (*Panulirus ornatos*) e outras três estirpes: *B. pumilus* B3.10.2B, *B. cereus* D9, *Lactobacillus plantarum* T13 foram adicionadas na alimentação de *Panulirus ornatos* e foram desafiados contra o patógeno *Vibrio owensii* DY05. Como resultado, pode-se observar que as lagostas juvenis tratadas com probiótico apresentaram maior crescimento e aumentaram a taxa de sobrevivência após o desafio com o patógeno.

Diante todas as citações anteriores, pode-se observar que na literatura há relatos de diversos gêneros de bactérias que foram isolados de ambiente aquático que são capazes de produzir substâncias antimicrobianas, que podem inibir o crescimento ou matar outros

gêneros de bactérias, portanto, há uma possibilidade de aplicação biotecnológica na área de saúde e industrial e também no meio ambiente que apresenta desequilíbrio.

1.4.1 O gênero *Aeromonas*

O gênero *Aeromonas* é pertencente ao filo Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria, ordem Aeromonadales e família Aeromonadaceae, compartilhando essa família com os gêneros *Tolomonas* e *Oceanimonas* Gonçalves Pessoa *et al.*, 2019. Na etimologia *Aeromonas*, “*aer*” do grego representa gás e “*mona*” unidades, um termo usado para representar bactérias produtoras de gás, em 1936. Em 1943, foi utilizado para o gênero bacteriano, já que é capaz de produzir gás a partir da glicose (Gonçalves Pessoa *et al.*, 2019). O gênero *Aeromonas* é composto por 36 espécies de bactérias (Fernández-Bravo & Figueras, 2020). As estirpes do gênero são anaeróbicas facultativas, de vida livre, não são formadoras de endósporos. Reduzem nitrito e nitrato, oxidase e catalase positivo e são fermentadoras de glicose (Janda & Abbott, 2010; Gonçalves Pessoa *et al.*, 2019; Fernández-Bravo & Figueras, 2020; Gonzalez-Avila *et al.*, 2021).

Classificar estirpes do gênero *Aeromonas* à nível de espécie, pelo uso de métodos fenotípicos, é uma tarefa difícil, já que muitas vezes não se consegue identificar corretamente algumas espécies que são muito semelhantes. Sendo assim, faz-se necessária a realização de análises mais complexas, como por métodos moleculares. Para este propósito é recomendado o uso de genes de manutenção (*Housekeeping Genes*), como os genes: *gyrB* e *rpoD*. Ou por meio de técnicas que analisem índices genômicos, como a avaliação da identidade média de nucleotídeos, do inglês, *Average Nucleotide Identity* (ANI) ou a hibridização DNA-DNA *in silico* (DDH), sempre comparando-os com estirpes tipo (Fernández-Bravo & Figueras, 2020).

As estirpes do gênero *Aeromonas* são amplamente distribuídas em diversos ambientes. Porém o ambiente nativo desse gênero é o aquático, sendo assim, as estirpes podem ser encontradas em todos os ambientes aquáticos, como lagos, rios e mares. Têm sido isoladas tanto de água potável como de esgoto (Janda & Abbott, 2010; Fernández-Bravo & Figueras, 2020; Gonzalez-Avila *et al.*, 2021). Devido à grande capacidade adaptativa, também podem ser isoladas de solos, plantas, aves, répteis e anfíbios

(Gonçalves Pessoa *et al.*, 2019). Como também, podem ser isoladas do trato gastrointestinal de animais de sangue quente e frio e de alimentos como vegetais, leite e carnes (Stratev & Odeyemi, 2016). A água e os alimentos contaminados são importantes veículos de transmissão destes microrganismos, causando doenças que estão relacionadas a casos de gastroenterite e outras infecções (Kirov, 1993; Jung & Matthews, 2016). As bactérias desse gênero são consideradas oportunistas, podendo causar infecções em animais marinhos, como peixes que estão sob condições de estresse e também podem acometer humanos imunocomprometidos (Gonçalves Pessoa *et al.*, 2019). Há relatos de estirpes que foram isoladas de coelhos, cães, gatos, galinhas e crustáceos com infecções. Algumas das doenças que elas podem causar em animais são: furunculose, úlceras e hemorragias (Fernández-Bravo & Figueras, 2020; Gonzalez-Avila *et al.*, 2021). As espécies principais que podem causar infecções humanas são: *A. dhakensis*, *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii*, podendo causar feridas, diarreias, gastroenterite, quando não tratado de forma correta, podem gerar septicemia (Gonçalves Pessoa *et al.*, 2019).

Estirpes do gênero *Aeromonas* podem apresentar fatores de virulência, podendo assim se aderir, colonizar e invadir a célula hospedeira. Possuem a capacidade de produzir diversos compostos, como enzimas e toxinas (Gonçalves Pessoa *et al.*, 2019). Algumas estirpes possuem a capacidade de resistir a alguns antimicrobianos, tendo em conta que já foram relatados mecanismos de resistências, como a produção das enzimas β -lactamase e carbapenemase. Já foram descritas classes de β -lactamases para o gênero: classe C (cefalosporinase), classe D (penicilinase) e classe B (metalo- β -lactamase) (Gonzalez-Avila *et al.*, 2021). Alguns trabalhos mostram que as estirpes do gênero *Aeromonas* produzem substâncias antimicrobianas que podem ser utilizadas para o controle biológico de outros gêneros de bactérias. As estirpes do gênero *Aeromonas* também produzem enzimas, como proteases, que podem apresentar um potencial biotecnológico (Khan *et al.*, 2008). Um trabalho realizado por Gibson (1998) reportou a produção de uma substância inibitória semelhante a bacteriocinas, por *Aeromonas media* A199, com atividade antagonista contra as estirpes testadas de *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *A. veronii v. sobria*, *Listonella anguillarum*, *Photobacterium damsela*, oito espécies do gênero *Vibrio* e *Yersinia ruckeri*.

1.4.2 O gênero *Acinetobacter*

O gênero *Acinetobacter* é composto por 65 espécies bacterianas, caracterizadas por serem cocobacilos, Gram-negativas, aeróbios estritos, catalase positivo e oxidase negativos, não sendo fermentativos, esporulantes, móveis e fastidiosos (Carvalho, Silva & Teixeira, 2021). São encontrados em diversos ambientes, em animais e em humanos (Matsunaga, 2012; Carvalho, Silva & Teixeira, 2021). As estirpes do gênero *Acinetobacter* podem sobreviver, por um longo período, no ambiente em superfícies secas, podendo chegar a meses (Matsunaga, 2012). A classificação taxonômica por métodos moleculares pode ser realizada pelo uso da técnica *multilocus sequence typing* (MLST) por meio do gene *rrs* que codifica o rRNA 16S, como também os genes de manutenção *gltA*, *gyrB*, *gdhB*, *recA*, *cpn60*, *gpi* e *rpoD* (Ibrahim *et al.*, 2021).

Existem estirpes patogênicas e não patogênicas, sendo a espécie *Acinetobacter baumannii* classificada como pertencente ao grupo de bactérias conhecidas por sua patogenicidade, nomeado de “ESKAPE” (Ibrahim *et al.*, 2021; De Oliveira *et al.*, 2020). Dentre elas temos: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e algumas espécies de *Enterobacter* (De Oliveira *et al.*, 2020). A espécie *Acinetobacter baumannii* já foi relatada como causadora de surtos em hospitais, causando grande prejuízo na área da saúde. Algumas espécies são de importância clínica, como as: *A. calcoaceticus*, *A. lactucae*, *A. nosocomialis*, *A. pittii* e *A. seifertii* (Carvalho, Silva & Teixeira, 2021). Bactérias do gênero *Acinetobacter* são patógenas emergentes que podem causar doenças em humanos, como meningite, pneumonia e endocardite (Carvalho, Silva & Teixeira, 2021). Outros fatores de virulência utilizados por *Acinetobacter baumannii* são: a adesão, formação de biofilme e secreção de toxinas (Ibrahim *et al.*, 2021). Além disso, algumas estirpes do gênero *Acinetobacter* podem apresentar resistência a diversos antibióticos, desenvolvendo múltiplos mecanismos de resistência. Há relatos de estirpes resistentes aos antibióticos da classe de β -lactâmicos de amplo espectro, como: as carboxipenicilinas, as cefalosporinas (3ª geração) e os carbapenêmicos. Além disso, também são capazes de produzir enzimas que modificam aminoglicosídeos (Ibrahim *et al.*, 2021).

Uma das espécies conhecidas por não serem patogênicas é a espécie *Acinetobacter baylyi* ADP1 que é encontrada em solos, bastante conhecida por sua diversidade metabólica, transformação natural e poder de recombinação (Santala & Santala, 2021). Outro ponto importante, é que o gênero *Acinetobacter* foi reportado na literatura como produtor de substâncias antimicrobianas. A estirpe *Acinetobacter baumannii* JE6 possui a capacidade de produzir bacteriocina que pode ser utilizada contra os patógenos: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Typhi ATCC 19214, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* e *Bacillus cereus* (Conceição *et al.*, 2018).

1.5 - Ambientes de coleta: peixes de feira livre, Lagoa Rodrigo de Freitas e Rio São Benedito

As bactérias utilizadas nos capítulos 2 e 3 desta tese, para fazer o *screening* e sequenciamento genômico, são oriundas de peixes e de ambiente aquático. Em relação às bactérias oriundas de peixes foram isoladas de dois indivíduos da espécie *Mugil brasiliensis* (nome popular: tainha) e três indivíduos da espécie *Caranx latus* (nome popular: xerelete) (Figura: 7), todos comprados em uma feira livre, localizada no bairro Vila Isabel na cidade do Rio de Janeiro – RJ, Brasil (–22.910468, – 43.240857).

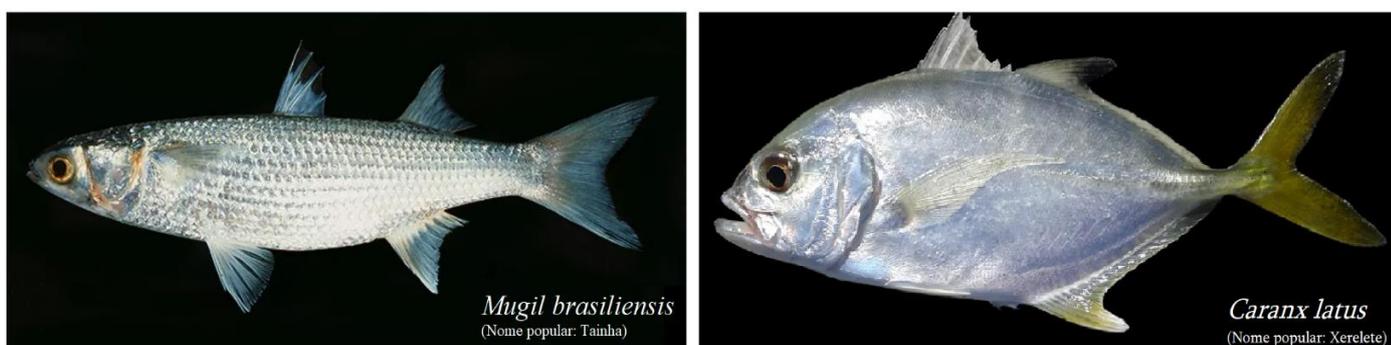


Figura 7: Peixes utilizados para o isolamento das bactérias do capítulo 2 e 3. Espécies: *Mugil brasiliensis* e *Caranx latus*. Foto retirada de <https://indiabiodiversity.org/species/show/232794> e <https://ncfishes.com/marine-fishes-of-north-carolina/caranx-latus-2/>. Data de acesso: 10/04/2023.

As bactérias de ambiente aquático utilizadas para o *screening* do capítulo 2 e 3 foram coletadas de amostras em seis pontos diferentes da Lagoa Rodrigo de Freitas. Todas as etapas de coleta e isolamento foram realizadas anteriormente, pela equipe da professora Dra. Ângela Correa de Freitas-Almeida, UERJ/RJ.

A Lagoa Rodrigo de Freitas é uma lagoa costeira que está localizada no estado do Rio de Janeiro, Brasil (latitudes 43°11'09" N e 43°13'03" S e longitudes 022°57'02" E e 022° 58'09" W) (Figura 8). Está situada próxima aos bairros: Gávea, Jardim Botânico, Leblon, Ipanema e Copacabana, sendo um dos pontos turísticos mais populares do Rio de Janeiro. Com uma área de 2,4 milhões m² é muito utilizada em competições náuticas (Magnani, 2004). Possui um ecossistema com características lagunar estuarino e sofrem impactos ambientais, como os impactos causados pelas moradias convencionais e sub convencionais (comunidades carentes). O crescimento populacional acarreta no aterramento das áreas no entorno da lagoa, para gerar moradia. Um dos impactos causados pela poluição é a mortandade de peixes e extinção de espécies de flora e fauna antes características da área. Além disso, o impacto da urbanização causa a insalubridade da água (Rodrigues, 2012). O sistema de coleta de esgoto funciona de forma independente, porém devido à falta de manutenção, operação e crescimento demográfico ocorrem sobrecargas no sistema que acabam desembocando na Lagoa Rodrigo de Freitas, acarretando em mais poluição da lagoa (Soares *et al.*, 2012). Existem projetos, como o do professor Dr. Mário Moscatelli, que visam minimizar os efeitos antropogênicos, como o projeto de revitalização ambiental da Lagoa Rodrigo de Freitas que visa restaurar a vegetação natural das margens da lagoa, por meio do plantio de vegetação de mangue vermelho e branco (Moscatelli & Almeida, 1993; Águas do Rio, 2021).



Figura 8: Lagoa Rodrigo de Freitas, localizada no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Foto retirada de <https://invexo.com.br/blog/quem-foi-rodrigo-de-freitas/>. Data de acesso: 10/04/2023.

As amostras utilizadas no capítulo 4 foram coletadas de quatro pontos do Rio São Benedito (Figura 9) e de quatro gêneros de peixes: *Serrasalmus rhombeus* (nome popular: piranha preta), *Cicla mirinae* (nome popular: tucunaré de fogo), *Zungaro Zungaro* (nome popular: jaú) e *Hydrolycus scomberoides* (nome popular: cachorra) (Figura 10). Todos característicos do Rio São Benedito.

O Rio São Benedito é um rio localizado no estado do Pará, no centro-norte do Brasil (09°05'39''S - 55°42'55''W), tendo como bioma o encontro do Cerrado e da região Amazônica. Sendo assim é cercado pela maior floresta tropical do planeta (Dahiti, 2023). Tem como foz o Rio São Manuel e é afluente do Rio Teles Pires. Em 2001, o Rio São Benedito tornou-se uma das primeiras áreas de prática de pesca esportiva, denominada Reserva Estadual de Pesca Esportiva Rio São Azul/Rio São Benedito, tendo como objetivo o lazer, sendo necessário devolver os peixes ao seu habitat natural. Existe uma grande diversidade de peixes na região, conhecidos popularmente por: cachorras, bicuda,

jaús, pacu-borracha, traíras, jacundás, piranhas e tucunarés-fogo. Existem diversas reservas no entorno do rio, como a Reserva dos Índios Kayabi, o Parque Estadual do Cristalino e a Reserva da Aeronáutica da Serra do Cachimbo. Essas reservas auxiliam na conservação da biodiversidade endêmica, como a dos peixes, das aves e dos vegetais (Pará Turismo, 2018). Um afluente do Rio São Benedito é o Rio Azul, também conhecido como “*Blue Lagoon*”, este rio, em alta temporada chuvosa, apresenta-se com grande volume e a coloração das águas em tom chá. Já em épocas de seca, as corredeiras ficam mais desafiadoras e a coloração da água passa a ser cristalina. A figura 9 representa um mapa com a localização do Rio São Benedito e do Rio Azul.

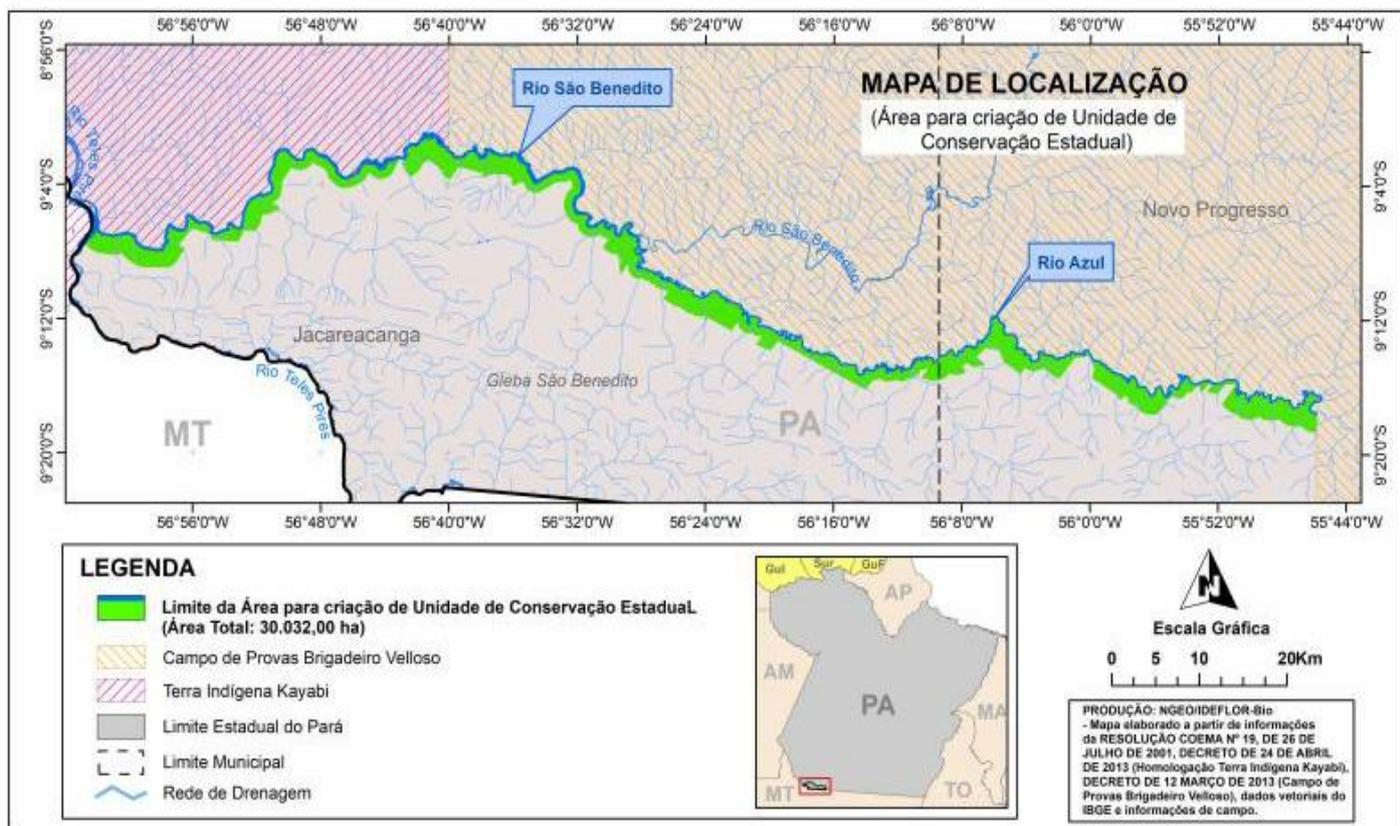


Figura 9: Mapa da localização do Rio São Benedito, localizado no estado do Pará. Foto retirada de <https://www.agenciapara.com.br/noticia/32350/governo-do-estado-cria-refugio-de-vida-silvestre-rios-sao-benedito-e-azul>. Data de acesso: 10/04/2023.

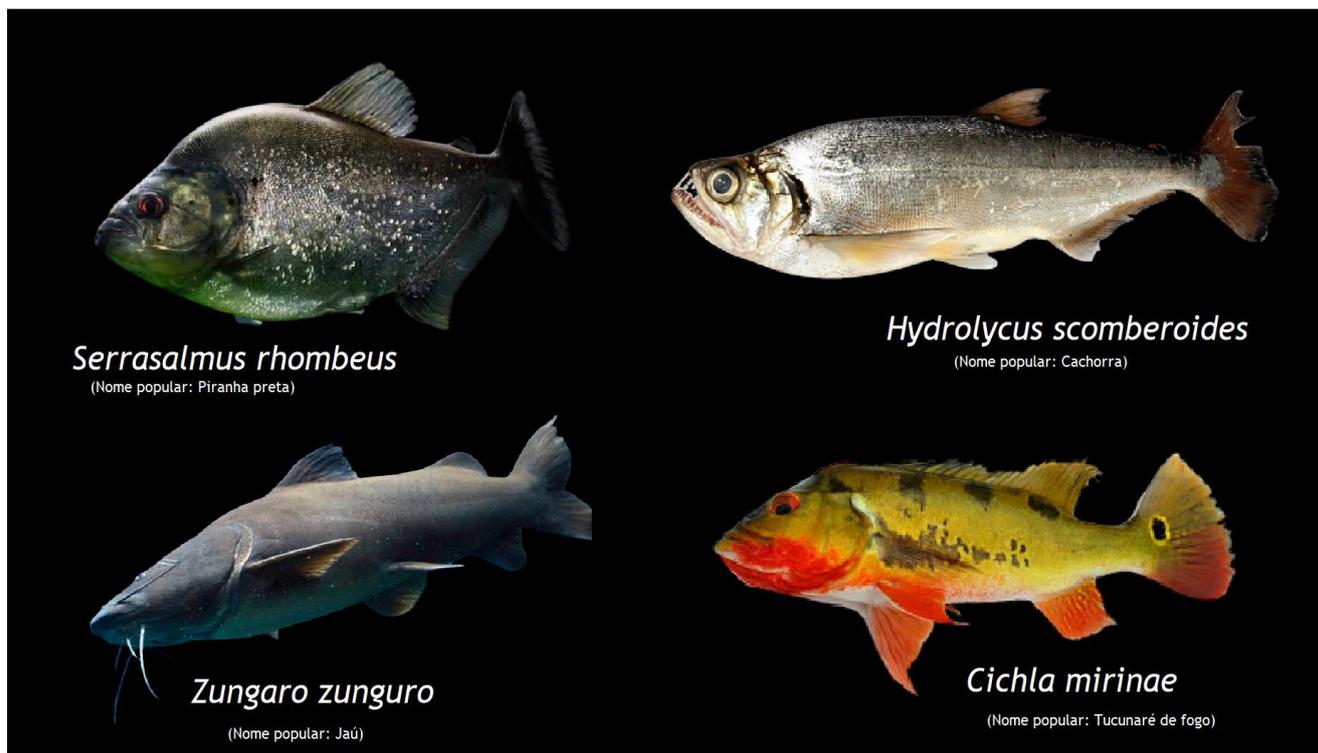


Figura 10: Peixes popularmente encontrados no Rio São Benedito e selecionados para a coleta. Fotos dos peixes retirada de <https://myaquarium.com.br/peixes/peixes-de-agua-doce/piranha-preta-serrasalmus-rhombeus/>, <https://www.sinopenergia.com.br/aquario/>, <https://www.flickr.com/photos/fabiomanfredini/6982427080>, <http://segredodapesca.blogspot.com/2015/02/>. Data de acesso: 10/04/2023.

1.6 - A era das Ômicas

Existem diversas linhas de pesquisas que podem inserir as abordagens ômicas para facilitar e chegar em resultados de uma forma mais rápida. A bioprospecção de microrganismos para detectar a produção de novas substâncias antimicrobianas, se encontra atualmente em um novo patamar, devido aos avanços da tecnologia de sequenciamento. Há uma grande quantidade de dados genômicos, metabolômicos e transcriptômicos, fornecendo uma oportunidade de fazer essa triagem de forma mais rápida e precisa (Tracanna *et al.*, 2017). Hoje, é uma prática comum sequenciar genomas bacterianos para descobrir novas substâncias promissoras. As tecnologias de sequenciamento de genoma reduziram o tempo gasto em métodos tradicionais de

bioprospecção, permitindo, por exemplo, que os cientistas rastreiem massivamente novas substâncias putativas (Egan *et al.*, 2018).

Durante anos, a ciência vem buscando novos compostos capazes de atuar contra as bactérias multirresistentes, porém diversas pesquisas não chegaram a um resultado promissor. Atualmente, ao explorar ambientes novos, as ferramentas para mineração de genomas contribuem para a descoberta de novos compostos (Hutchings, Truman & Wilkinson, 2019).

1.6.1 Genômica

A era genômica iniciou-se graças à potencialização da genética molecular por meio de avanços em biologia molecular, sequenciamento e bioinformática. A história começa em 1953, quando a estrutura da molécula de DNA foi descrita por Watson e Crick, mostrando as ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas, na qual a base nitrogenada Adenina (A) liga-se com a Timina (T) e as bases nitrogenadas Guanina (G) liga-se com Citosina (C) (Watson & Crick, 1953; Christoff, 2017). Este feito foi muito importante, pois conhecer a sequência em que esses nucleotídeos se organizam foi fundamental para o surgimento das primeiras tecnologias de sequenciamento e consequentemente o início do estudo da genômica, entre os anos de 1970-1980 (Christoff, 2017). Inicialmente os métodos eram de degradação química, o qual marcavam o DNA de interesse, fragmentavam com reagentes químicos para ler em gel de poliacrilamida (Maxam & Gilbert, 1977), esse método descrito por Maxam-Gilbert, era capaz de sequenciar apenas alguns nucleotídeos por vez (Goodwin, McPherson & McCombie, 2016).

Outra técnica foi desenvolvida por Sanger e Coulson, na qual era baseada em reações enzimáticas (DNA polimerase), utilizando marcadores radioativos (Doblas & Louro, 2021; Heather & Chain, 2016). Após, Sanger conseguiu aperfeiçoar sua técnica e criou o método de terminação de cadeia por dideoxynucleotídeos, ou método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977), dando início a era do sequenciamento de primeira geração acelerada pelo uso de Taq Polimerase e PCR (Doblas & Louro, 2021; Heather & Chain, 2016). Neste tempo houve muitos ganhos e avanços como o início do projeto Genoma Humano na década de 90.

O método de Frederik Sanger (1977), conhecido por método de terminação de

cadeia, é eficaz para sequências de 500 - 900 pb. Algumas das aplicabilidades são: sequenciamento de pequenos fragmentos de DNA, plasmídeos bacterianos e amplificação de DNA por reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês, *polymerase chain reaction*). O primeiro sequenciador automático foi o ABI 370, lançado em 1986. Posteriormente, foi lançado o ABI 3700 em 1998. Como era muito caro e trabalhoso realizar grandes projetos com essa técnica, logo foram descritas novas técnicas (Goodwin, McPherson & McCombie, 2016).

Inicialmente as técnicas eram voltadas para o estudo de fragmentos pequenos, com o passar do tempo e avanço das tecnologias e conhecimento químico das moléculas, foi possível iniciar o sequenciamento de DNA em larga escala (Christoff, 2017). Com qual foi possível automatizar as técnicas de PCR e de Sanger e de sequenciamento por meio da técnica, do inglês, *Shotgun Sequencing* (Doblas & Louro, 2021). Algumas plataformas de sequenciamento de nova geração são listadas na Tabela 2.

O Sequenciamento de Nova Geração (NGS, do inglês, *Next-Generation Sequencing*), também conhecido por Sequenciamento Massivo em Paralelo (do inglês, *Massively Parallel Sequencing*) ou Sequenciamento de Alta Performance (do inglês, *High-throughput Sequencing*) são termos utilizados para designar o sequenciamento com as novas tecnologias que geram um grande volume de dados em comparação com a metodologia antiga de Sanger (Goodwin, McPherson & McCombie, 2016; Christoff, 2017). Essas novas técnicas permitem o sequenciamento do DNA ou RNA de uma forma automatizada, com processamento paralelo massivo dos fragmentos e com alto rendimento. Sendo uma maneira rápida e mais barata do que o método de Sanger. O NGS faz o sequenciamento de fragmentos curtos do DNA, geralmente de 50 - 300 nucleotídeos, podendo processar até bilhões de fragmentos ao mesmo tempo, antes só era possível ler 96 fragmentos por vez (Goodwin, McPherson & McCombie, 2016).

Tabela 2: Tipos de sequenciamento genômico em larga escala NGS segunda e terceira geração.

NGS	Nome	Tipo de Sequenciamento	Metodologia	Tamanho da sequência	Quantidade de Leituras
2º Geração	Roche / 454	Pirosequenciamento	Detecção de pirofosfato liberado durante a incorporação de um nucleotídeo na fita de DNA recém-sintetizada.	600 - 1000 pb	0.1 M - 1M
	SOLiD	Sequenciamento por ligação	Por meio da incompatibilidade da DNA ligase, é possível identificar a sequência do nucleotídeo, usando-se quatro corantes, que identificam as 16 possibilidades de combinações de dois nucleotídeos, e diversas sondas modificadas. A combinação de nucleotídeos fica em uma ponta da sonda e o fluoróforo fica na outra ponta. Ao ocorrer o anelamento na sequência de DNA, o sinal luminoso é identificado, descobrindo assim os nucleotídeos.	50-75 pb	700 M- 1.4 B
	Ion Torrent	Semicondutores de Íons	Detecta o nucleotídeo por meio de íons de hidrogênio, quando a dNTP é incorporada, os íons H ⁺ liberados, alteram o pH do ambiente e formam uma alta voltagem positiva, assim o dispositivo consegue detectá-lo.	200 - 600 pb	0.1M - 80M
	Illumina	Sequenciamento por síntese	O processo identifica simultaneamente os nucleotídeos enquanto os incorpora em uma cadeia de ácido nucléico. O DNA é fragmentado e fixado na <i>flow-cell</i> , pelo pareamento com os adaptadores (DNA complementares). Então ocorre a amplificação, dando origem aos <i>clusters</i> (fita simples). Esses <i>clusters</i> dão origem ao sequenciamento, por meio da enzima DNA polimerase.	36 - 300 pb	14 M - 4B
3º Geração	PacBio-Pacific Biosciences	Sequenciamento de moléculas únicas	Utilizam a mudança nas propriedades elétricas do DNA, o qual se transloca em canais. Ao final do canal, a plataforma identifica a base do nucleotídeo correta	8-20 Kb	0.05 -0.35 M
	Nanopore (Oxford)			200 Kb	>100 M

A linha cronológica dos avanços das tecnologias de sequenciamento, como os estudos químicos das moléculas de DNA, pode ser observada na Figura 11.

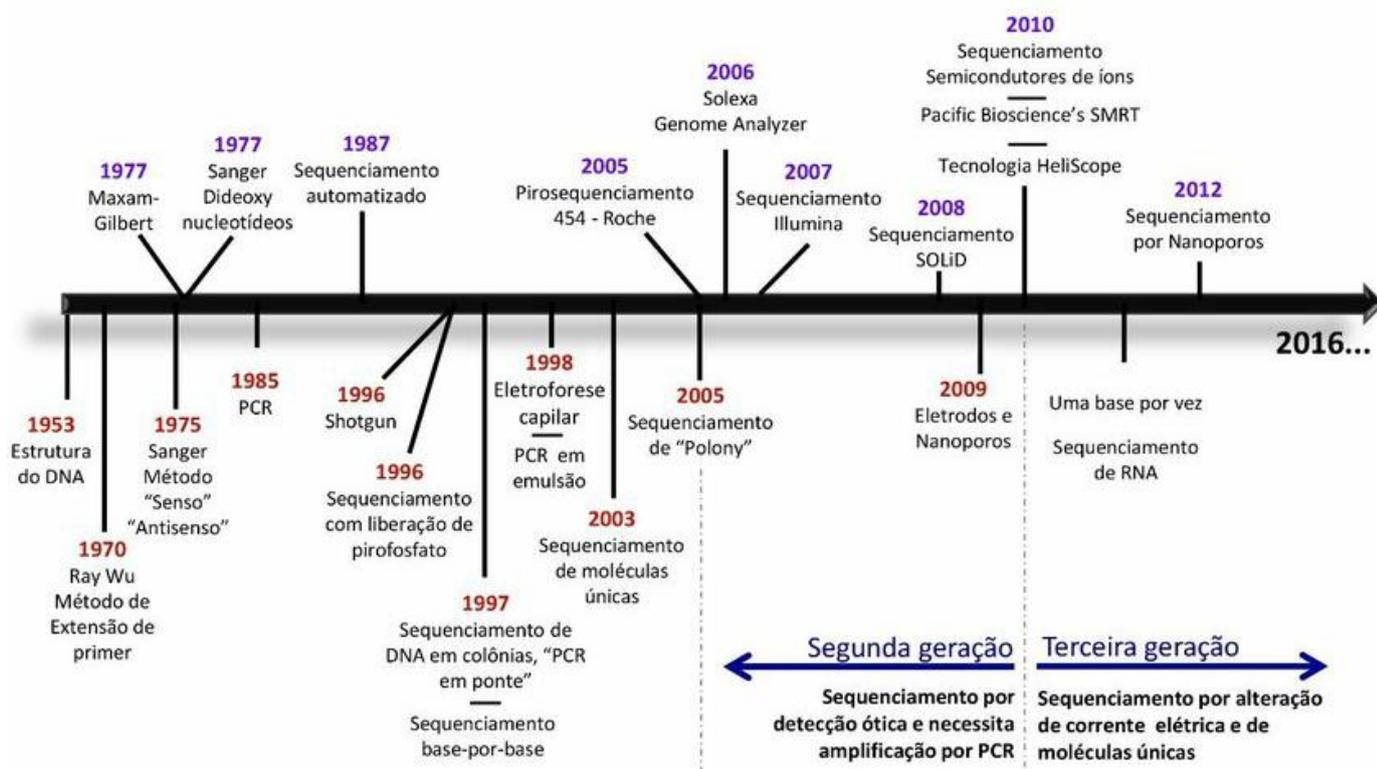


Figura 11: Apresentação cronológica das tecnologias de sequenciamento de DNA e avanços no estudo da biologia molecular. Figura retirada do livro: Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações, Capítulo 2 (Christoff, 2017).

Devido ao progresso da tecnologia de sequenciamento de DNA, cerca de 6.330 genomas completos foram publicados no *Genome Online Database (GOLD)*. Com a alta quantidade de montagem, a busca por substâncias antimicrobianas por meio de ferramentas de bioinformática para a mineração de genoma vem sendo muito utilizada. As ferramentas foram aprimoradas e alguns estudos se concentraram nas vias: NRPS, PKS ou NRPS-PKS híbridas, devido essas possuírem um tamanho grande e *motifs* repetitivos, sendo mais fáceis de serem identificados. A ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* é bastante utilizada para a mineração de genoma, mas alguns programas específicos foram implementados, como: NapDos e AntiSMASH (Desriac *et al.*, 2013).

Os microrganismos podem possuir diversos agrupamentos de genes biosintéticos (BGCs) que codificam para a biossíntese de moléculas, porém nem todos resultam em

produtos naturais com atividade, sendo necessária a implementação de novas abordagens para minerar produtos naturais com atividade antimicrobiana. Buscar BGC em bactérias é uma pesquisa promissora para encontrar novas substâncias antimicrobianas, existem ferramentas capazes de fazer essa identificação. Algumas ferramentas conhecidas são: AntiSMASH (Weber *et al.* 2015), BAGEL3 (Van Heel *et al.* 2013) e PRISM (Skinnider *et al.* 2016) normalmente baseando-se em propriedades compartilhadas entre as diversas vias biossintéticas (Tracanna *et al.*, 2017). Um exemplo citado no trabalho de Tracanna e colaboradores (2017) foi a enzima de modificação para produção de lantipeptídeos que é bem conservada, podendo ser utilizada como assinatura na mineração de genomas.

1.6.2 Metagenômica

Devido ao melhoramento e avanços nas tecnologias de sequenciamento o estudo de microbiomas, pelo uso do sequenciamento, vem crescendo. As metodologias, programas e bancos de dados estão aperfeiçoando-se para atender melhor os objetivos das pesquisas, já que os sequenciamentos de metagenomas geram uma grande quantidade de dados a serem processados, necessitando um alto poder computacional. Os programas visam minimizar o uso de memória e requisito de processamento. O estudo de microbiomas pelo sequenciamento do metagenoma ajudou a explorar novos microrganismos, os quais não poderíamos conhecer com os métodos iniciais de estudo, a taxonomia tradicional (Breitwieser *et al.*, 2019).

O estudo do microbioma possui duas aplicabilidades, o estudo da biodiversidade pelas técnicas de metataxonomia e a investigação de propriedades funcionais de cada metagenoma. A metataxonomia baseia-se no sequenciamento dos genes marcadores, como os RNA ribossomais (16S e 18S), que são conservados entre os táxons e presentes em todos os organismos da amostra de estudo, ou de estudos de filogenia envolvendo o genoma completo, a filogenômica. Como também, pode-se analisar os microbiomas através da abordagem de metagenoma, na qual sequenciam todos os genomas presentes no *pool* da amostra, podendo muitas vezes separá-los para estudar funcionalmente os indivíduos. Marchesi e Ravel são os pesquisadores responsáveis por classificar as duas formas de estudo do microbioma, no passado ambas as análises eram classificadas como metagenoma (Marchesi & Ravel, 2015). Uma outra abordagem metodológica é a metatranscriptômica que atua sequenciado todas as moléculas de RNA, criando um perfil de todos os genes ativos que são transcritos na amostra (Breitwieser *et al.*, 2019).

A metagenômica analisa os genomas contidos em uma amostra ambiental. Por meio dela, pode ser observada além da diversidade microbiana contida no ambiente, como também, a composição funcional dos genes contidos nessa amostra. Sendo assim, fornece uma visão mais completa do que apenas as classificações filogenéticas, como as análises de metataxonomia (Thomas, Gilbert & Meyer, 2012). Dentro de cada ecossistema, como o solo, animais, plantas, amostras de água existe uma comunidade de microrganismos que possuem um potencial metabólico. Estudar esse microbioma é importante para compreender os diferentes BGCs produzidos, que podem codificar produtos com atividade antimicrobiana. Sendo assim, a metagenômica é fundamental para traçar um perfil desses compostos nas diferentes comunidades e suas abundâncias. Pelo uso das análises de metagenômicas há a possibilidade de criar hipóteses de possíveis aplicações e funcionalidades que os microrganismos podem exercer (Thomas, Gilbert & Meyer, 2012).

As etapas da análise de metagenomas são: extrair o DNA total da amostra e sequenciar todo o DNA extraído, o metagenoma. Após, é realizada a análise de qualidade das sequências brutas e faz-se o corte de qualidade. Em relação à montagem, deve-se montar organizando as sequências, os *contigs*, e então agrupá-los em *bins*, que são os genomas de cada espécie contido na amostra. Depois, é realizada a anotação funcional e as análises estatísticas (Thomas, Gilbert & Meyer, 2012).

O DNA deve ser extraído de forma a representar todas as células compostas na amostra, como também deve ser extraída quantidade suficiente e em alta qualidade para assim, iniciar a etapa de preparo da biblioteca e sequenciamento metagenômico. Deve-se garantir a retirada do material genético do hospedeiro, caso a amostra seja oriunda de algum, fazendo a lise seletiva ou fracionamento. Em alguns casos pode-se fazer o fracionamento físico, quando se quer analisar apenas uma parte da comunidade. Alguns tipos de amostras, como biópsias e águas subterrâneas, geram quantidades pequenas de DNA, sendo necessária à amplificação do material genético, para assim, realizar o sequenciamento genômico (Thomas, Gilbert & Meyer, 2012).

Em relação a classificação funcional dos genes, o banco de dados do inglês *Clusters of Orthologous Genes* (COG) (Galperin *et al.*, 2021) é muito utilizado, podendo unificar a anotação do genoma em grupos de organismos relacionados; detectar a presença e ausência de genes no genoma completo; verificar vizinhança genômica, permitindo descobrir novos sistemas funcionais; verificar vias metabólicas e enzimas;

comparar organismos pela categorização funcional (COG) e também pode priorizar alvos para fazer a caracterização tanto estrutural, como funcional (Galperin *et al.*, 2021). O banco de dados teve início em 1997, conta aproximadamente com os genomas completos de 1.187 bactérias e 122 Archaea, que podem mapear em torno de 1.234 gêneros. Ele lista as proteínas em grupos por vias e sistemas funcionais. Como: A= processamento e modificação do RNA; B= estrutura e dinâmica da cromatina; C= produção e conversão de energia, entre outras.

Fazer a classificação taxonômica de todos os organismos presentes em uma amostra é difícil, como também há microrganismos não cultiváveis. Sendo assim, a técnica de sequenciamento metagenômico, permite a detecção dos microrganismos que compõem uma amostra, de forma rápida. Uma das aplicações que está sendo implementada com essa tecnologia é a capacidade de melhorar o diagnóstico clínico (Ye *et al.*, 2019). Por ser uma técnica que faz o sequenciamento de todos os genomas contidos em uma amostra, há um desafio computacional para fazer a classificação taxonômica de todos os organismos. O primeiro desafio é fazer a classificação em uma grande quantidade de sequências curtas geradas pelo sequenciador, em torno de 50 a 200 nucleotídeos. Em segundo, esse desafio é intensificado pelo crescimento exponencial de genomas sequenciados, aumentando o número de sequências para serem comparadas. Mesmo a ferramenta BLAST, sendo um método sensível para realizar alinhamento contra bancos de dados genômicos é muito custosa computacionalmente, tornando inviável a busca nos milhões de leituras geradas pelo sequenciamento metagenômico (Ye *et al.*, 2019). Existem ferramentas que classificam taxonomicamente e estimam o perfil de abundância de táxons, chamadas de classificadores. Para escolher a ferramenta, deve-se verificar entre elas, quais as melhores abordagens para o conjunto de dados de estudo, como também verificar a que tem a melhor precisão na classificação taxonômica, a ferramenta que tem o melhor desempenho na velocidade e os requisitos computacionais que elas necessitam (Ye *et al.*, 2019).

Existem as classificações de *binning* taxonômico e perfil taxonômico. O perfil taxonômico apresenta a abundância relativa dos táxons, já as análises de *binning* taxonômicos, fornecem a classificação de leituras individuais. Um perfil taxonômico pode ser criado pela categorização, contabilizando a classificação das leituras individuais. Os classificadores geram atribuições por meio de novas abordagens algorítmicas, permitindo rapidez e desempenho em classificar inúmeras leituras (Ye *et al.*, 2019). Para

as análises com genomas completos, o banco de dados RefSeq é um dos mais completos para espécies microbianas. A base de dados do BLAST, nucleotídeo (nt) e não redundante (nr), também possuem sequências de alta qualidade (~ 50-200 milhões). O banco de dados SILVA, também oferece uma grande quantidade de sequências do gene que codifica o rRNA 16S (~2 milhões). *Genbank* também oferece uma grande quantidade de genomas, porém com controle de qualidade inferior (Ye *et al.*, 2019).

JUSTIFICATIVA

A busca incansável por novos medicamentos capazes de matar ou inibir o crescimento de bactérias patogênicas multirresistentes é um grande desafio nas indústrias farmacêuticas. Anualmente 23 mil pessoas morrem devido a infecções causadas por bactérias multirresistentes nos Estados Unidos. Já no mundo, esse número pode chegar a 700 mil mortes por ano. Atualmente este problema afeta os indivíduos da sociedade mais vulneráveis, por não terem recursos e conhecimento sobre o uso correto dos antibióticos (Hemeg, 2017; Ayukekbong, Ntemgwa & Atabe, 2017). A criação de antibióticos sintéticos, como também a busca por barreiras para evitar os mecanismos de resistência das bactérias, vem sendo uma grande corrida para os pesquisadores. Buscar alternativas a esses antibióticos é um novo caminho que ajudará a minimizar o problema da resistência e adicionar um novo produto no mercado será de grande benefício tanto para a sociedade, que irão diminuir o número de mortes causadas por infecções por bactérias patogênicas resistentes, como também para as indústrias que conseguirem produzir e adicionar no mercado essas novas substâncias. As bactérias são grandes produtoras de metabólitos com atividade antimicrobiana, este trabalho anseia buscar essas novas substâncias. Sendo assim, a proposta desta pesquisa é buscar soluções para um grande problema de saúde pública. Novas substâncias com baixo custo de produção e alta eficiência é o esperado para minimizar esse grande problema atual. O uso de metodologias atuais da biologia molecular, pelo uso da genômica e metagenômica, fazem com que haja um avanço nas pesquisas em um tempo menor do que levaria buscando apenas com os métodos tradicionais de análises na bancada. Sendo assim, esse tipo de pesquisa tem um futuro promissor para busca de novas substâncias (Egan *et al.*, 2018). Para realizar esse trabalho, deu-se preferência ao ambiente aquático, por ser menos explorado e ter uma grande biodiversidade, possibilitando a descoberta de novas substâncias capazes de inibir o crescimento de outras estirpes bacterianas patogênicas.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Baseado nos resultados de Silva (2018) nossa hipótese central foi que o ambiente aquático seja propício para a bioprospecção de novas bacteriocinas e que os peixes, naturalmente, concentrariam bactérias de interesse biotecnológico. Para testar esta hipótese decidimos isolar as estirpes bacterianas oriundas de água e peixes para avaliar a atividade antagônica contra bactérias patogênicas, como também analisar os genomas e metagenomas (MAG) para inferir a origem da atividade e avaliar a biodiversidade microbiana presente nos peixes e na água de rios. Além de analisar mais profundamente os genomas do trabalho realizado em Silva (2018).

Objetivos específicos

- Analisar de uma forma mais profunda o genoma da estirpe **AE59-TE2** produtora de substância antimicrobiana contra diversas bactérias patogênicas;
- Fazer a identificação molecular da estirpe **AE59-TE2**;
- Detectar os genes que possam estar envolvidos na produção de substâncias antimicrobianas no genoma da estirpe **AE59-TE2**;
- *In silico*, montar os genomas da amostra **38-XC4** pelo uso da técnica de *Metagenome assembled genome* (MAG) e *binning*;
- Buscar os genes que estejam relacionados a produção de substâncias antimicrobianas nos dois MAGs da cultura mista **38-XC4**;
- Coletar amostras dos peixes das espécies *Serrasalmus rhombeus*, *Cichla mirinae*, *Zungaro zungaro* e *Hydrolycus scomberoides* habitantes do Rio São Benedito no estado do Pará- Brasil;
- Isolar as bactérias presentes nas amostras dos peixes da espécie *Serrasalmus rhombeus*;
- Detectar dentre as estirpes bacterianas isoladas dos peixes do Rio São Benedito, as produtoras de substâncias antimicrobianas com atividade contra bactérias potencialmente patogênicas e multirresistentes;

- Analisar os metagenomas das amostras oriundas da água e dos peixes da espécie *Serrasalmus rhombeus*;
- Buscar genes relacionados com a produção de substâncias antimicrobianas nos metagenomas;
- Comparar as bactérias isoladas produtoras de substâncias antimicrobianas com os resultados obtidos por meio das análises *in silico* dos metagenomas.

*ORGANIZAÇÃO DOS
CAPÍTULOS*

ORGANIZAÇÃO DOS CAPÍTULOS

Os capítulos foram divididos dentro das 3 grandes áreas da tese.

- **Capítulo 1:** Está presente a introdução, justificativa e objetivos
- **Capítulo 2:** É a apresentação das análises genômicas da estirpe AE59-TE2, na qual foi publicada em forma de artigo de pesquisa na revista *life* - MDPI, com o título: “***Aeromonas allosaccharophila* Strain AE59-TE2 Is Highly Antagonistic towards Multidrug-Resistant Human Pathogens, What Does Its Genome Tell Us?**”
- **Capítulo 3:** É a apresentação da Análise da cultura mista 38-XC4 que foi separada *in silico* com a técnica *Metagenome assembled Genome* (MAG), o artigo de pesquisa está em preparação, com o título: “***Metagenome Assembled Genome (MAG) of 38-XC4 a mixed-culture isolated from Caranx latus, (Xerelete) that is highly antagonistic towards human pathogens***”.
- **Capítulo 4:** Bioprospecção de bacteriocinas em amostras de água e de peixes da espécie *Serrasalmus rhombeus* (nome popular: piranha preta) do Rio São Benedito, Pará.

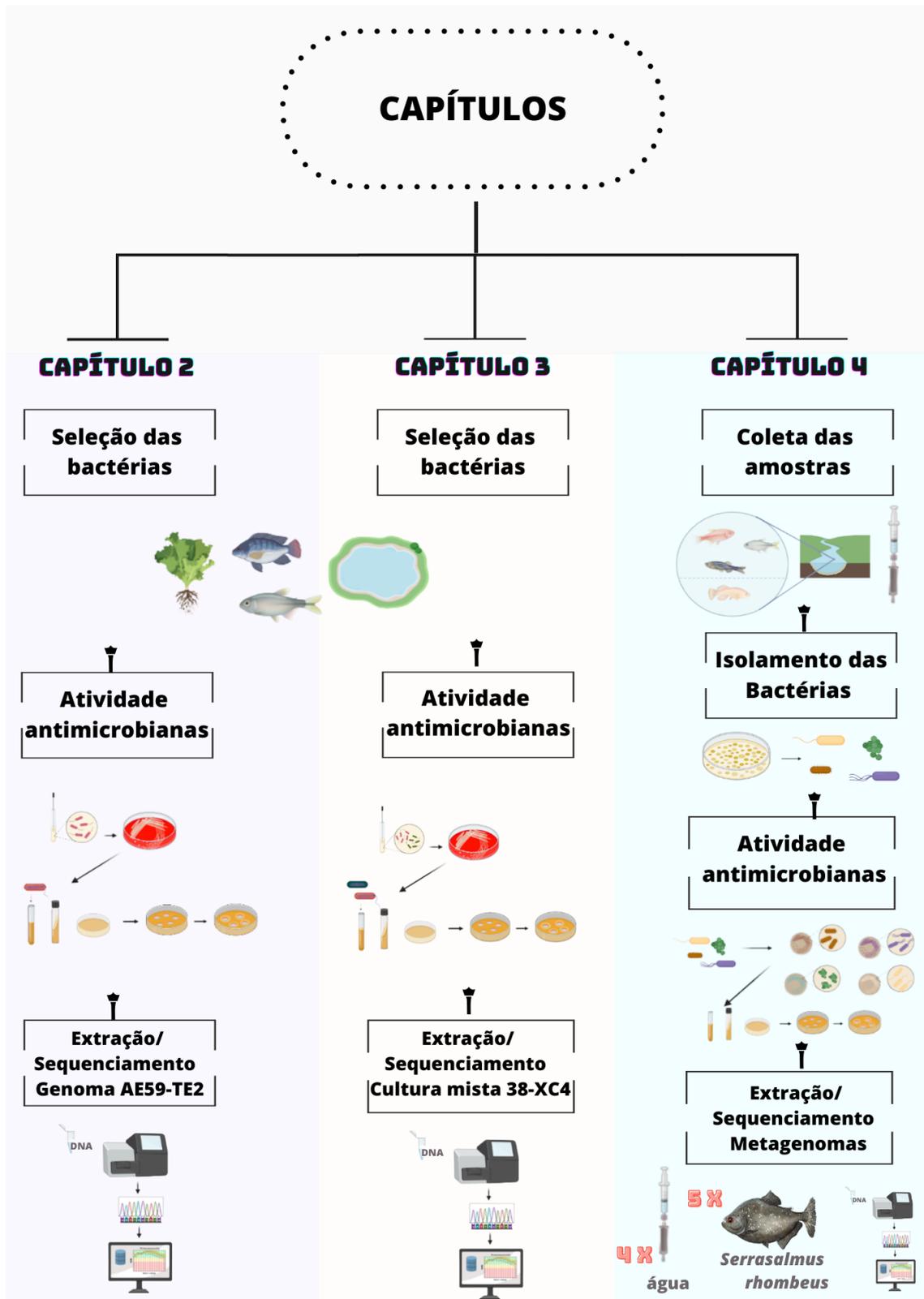


Figura 12: Esquema dos capítulos 2, 3 e 4 da tese. Figura feita com os programas: BioRender e Canva.

Capítulo 2

Aeromonas allosaccharophila Strain AE59-TE2 Is Highly Antagonistic towards Multidrug-Resistant Human Pathogens, What Does Its Genome Tell Us?

CAPÍTULO 2

***Aeromonas allosaccharophila* Strain AE59-TE2 Is Highly Antagonistic towards Multidrug-Resistant Human Pathogens, What Does Its Genome Tell Us?**

Link: [Aeromonas allosaccharophila Strain AE59-TE2 Is Highly Antagonistic towards Multidrug-Resistant Human Pathogens, What Does Its Genome Tell Us? - PMC \(nih.gov\)](#).

2.1 - Introdução

Neste capítulo foi apresentada a história da bactéria *Aeromonas allosaccharophila* estirpe AE59-TE2 oriunda do peixe da espécie *Mugil brasiliensis* conhecido popularmente como tainha coletado em feira-livre. Esta estirpe apresenta atividade antimicrobiana contra diversas bactérias patogênicas, como: *K. pneumoniae* (KPC, ESBL, 19ae ATCC 13883), *E. coli* e *E. coli* ESBL, *E. cloacae* NDM, *A. baumannii*, *S. typhimurium* ATCC 14028, *S. aureus* (ATCC 6538, HIV 86a e HIV 87a), *E. faecalis* 5ae e *P. aeruginosa*.

Os materiais e métodos estão apresentados em português e os resultados e discussão estão apresentados na forma de artigo, o qual já foi publicado como artigo de pesquisa na revista *life* - MDPI, com o título: “*Aeromonas allosaccharophila* Strain AE59-TE2 Is Highly Antagonistic towards Multidrug-Resistant Human Pathogens, What Does Its Genome Tell Us?”

2.2 – Material e Métodos

A figura 13 ilustra a metodologia utilizada no capítulo 2, o qual é analisado o genoma da estirpe AE59-TE2.

CAPÍTULO 2: GENÔMICA DA ESTIRPE AE59-TE2

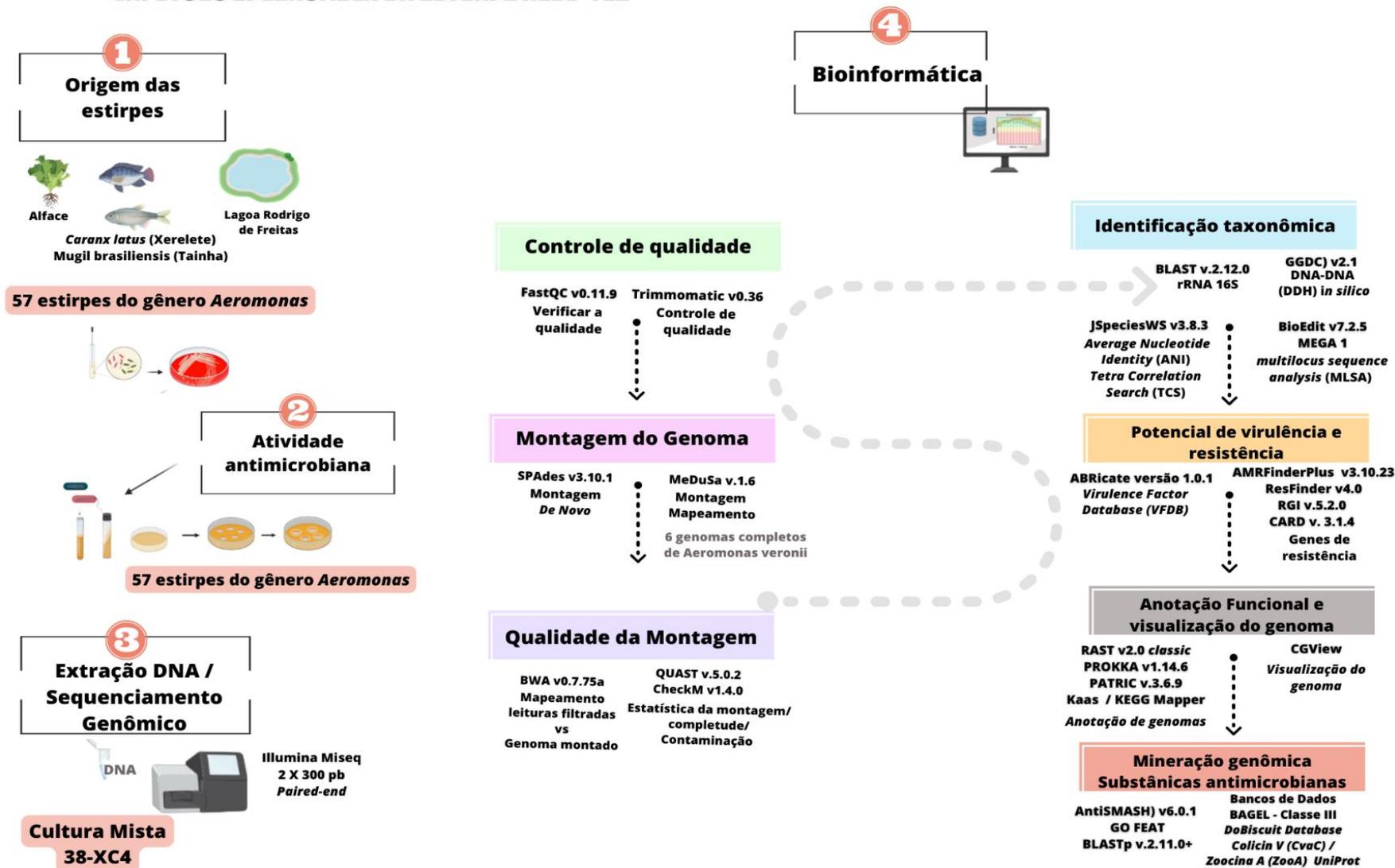


Figura 13: Esquema do Material e métodos do capítulo 2: “*Aeromonas allosaccharophila* Strain AE59-TE2 Is Highly Antagonistic towards Multidrug-Resistant Human Pathogens, What Does Its Genome Tell Us?”. Figura feita com os programas: BioRender e Canva.

2.2.1 Bactéria de estudo, atividade antimicrobiana e espectro de ação

As bactérias são oriundas da coleção de cultura do Laboratório de Genética de Microrganismos Associados a Alimentos e à Indústria (LGMAI), coletadas pelas professoras Dra. Selma Soares de Oliveira, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e Dra. Ângela C. de Freitas Almeida, Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ).

Dentre as 57 bactérias isoladas de brânquias, escamas e ânus de peixes de feira livre e da Lagoa Rodrigo de Freitas, 38 apresentaram atividade antimicrobiana contra estirpes patogênicas. A estirpe selecionada para realizar o sequenciamento genômico foi a estirpe AE59-TE2 isolada de peixe da espécie *Mugil brasiliensis*, conhecida popularmente como "tainha", coletado de feira-livre localizada no bairro Vila Isabel, cidade do Rio de Janeiro, RJ, Brasil (-22.910468, -43.240857). As 57 bactérias isoladas foram testadas contra *Klebsiella pneumoniae* KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), *K. pneumoniae* ESBL (produtora de β -lactamase de espectro estendido), *K. pneumoniae* ATCC 13883, *Escherichia coli* ESBL, *Enterobacter cloacae* NDM (New Delhi Metalo-beta-lactamase), *Acinetobacter baumannii*, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa* e *P. aeruginosa* SPM (São Paulo Metalo-beta-lactamase) do Laboratório de Investigação Médica; *E. coli*, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *P. aeruginosa* ATCC 15422 do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e *K. pneumoniae* 19ae, *Enterococcus faecalis* 5ae, *S. aureus* HIV 86a e *S. aureus* HIV 87a do Laboratório de Infecção Nosocomial por meio dos métodos de ensaio de difusão de poço de ágar (Tagg & McGiven, 1971) e pelo método do clorofórmio (Giambiagi-Marval *et al.*, 1990). Os resultados foram apresentados na forma de *cluster* hierárquico pelo uso da ferramenta GenePattern v2.0 (Reich *et al.*, 2006).

2.2.2 Extração de DNA e sequenciamento

A estirpe AE59-TE2 teve o seu DNA extraído pelo método CTAB (Ausubel *et al.*, 1997). O sequenciamento foi realizado com a plataforma Illumina Miseq (Rio de Janeiro, Brasil), foi utilizado aproximadamente 1 μ g de gDNA para construir a biblioteca *paired-end* (2 \times 300 pb) com o kit de preparação de amostras de DNA Nextera XT (Illumina, SanDiego, CA, EUA).

2.2.3 Processamento de dados e montagem do genoma da estirpe AE59-TE2

Os dados gerados pelo sequenciamento foram avaliados pela ferramenta FastQC v0.11.9 (Andrews, 2010). O controle de qualidade foi realizado pela ferramenta Trimmomatic v0.36 (Bolger *et al.*, 2014), removendo os adaptadores, bases com baixa qualidade, bases indefinidas (N) e leituras pequenas (<36 bp). O valor do corte de qualidade foi de (>Q30). O genoma foi montado com a associação da técnica *De Novo* através da ferramenta SPAdes v3.10.1 (Bankevich *et al.*, 2012) e com a técnica de mapeamento de *contigs* contra genomas de referência com a ferramenta MeDuSa v.1.6 (Bosi *et al.*, 2015), na qual os *contigs* foram ordenados e alinhados usando 6 genomas completos de *Aeromonas veronii* (Tabela 3). A espécie *Aeromonas veronii* foi selecionada por ser a espécie mais próxima e com os genomas mais completos depositados no NCBI. Para avaliar a qualidade da montagem, as leituras filtradas foram alinhadas aos *scaffolds* AE59-TE2 usando BWA v0.7.75a (Li & Durbin, 2010) e as estatísticas foram obtidas com Qualimap v2.2.1 (Okonechnikov *et al.*, 2016). CheckM v1.4.0 (Parks *et al.*, 2014) foi usado para verificar a integridade e contaminação do genoma. A ferramenta QUAST v.5.0.2 (Gurevich *et al.*, 2013) foi usada para verificar a qualidade do genoma. A biblioteca sequenciada AE59-TE2 e a montagem final do genoma foram depositadas no banco de dados NCBI sob os números de acesso *BioSample* SAMN08436981.

Tabela 3: Genomas completos de referência da espécie *Aeromonas veronii*, obtidos no banco de dados NCBI e usados na montagem do genoma da estirpe *Aeromonas allosaccharophila* AE59 pela plataforma MeDuSa v.1.3.

Genomas de referência de <i>Aeromonas veronii</i>					
Organismo	Estirpe	Acesso	Tamanho (MB)	GC (%)	Genes
<i>A. veronii</i>	AVNIH1	GCA_001634325.1	4.95506	58.48	4616
<i>A. veronii</i>	TH0426	GCA_001593245.1	4.92301	58.30	4602
<i>A. veronii</i>	CB51	GCA_001634345.1	4.5841	58.60	4247
<i>A. veronii</i>	X11	GCA_002803925.1	4.28329	58.80	3900
<i>A. veronii</i>	X12	GCA_002803945.1	4.77319	58.30	4440
<i>A. veronii</i>	B565	GCA_000204115.1	4.55178	58.70	4199

2.2.4 Identificação taxonômica da estirpe AE59-TE2

Vários métodos foram usados para identificação da estirpe a nível de espécies. Como identificação preliminar, foi realizada a análise do gene que codifica o rRNA 16S, por meio do servidor BLAST v.2.12.0, última atualização 03/11/2020 (Altschul *et al.*, 1990). Como as análises de RNAr 16S não são padrão-ouro para identificação a nível de espécie para o gênero *Aeromonas*, foram realizadas análises complementares: DDH *in silico*, ANI e MLSA.

Após, o genoma completo foi utilizado para realizar a análise Hibridização DNA-DNA (DDH) *in silico*, usando o servidor *Genome-to-Genome Distance Calculator* (GGDC) v2.1 (Auch *et al.*, 2010; Meier-kolthoff *et al.*, 2013) com 33 estirpes tipo do gênero *Aeromonas* obtidas no banco de dados EZBio *Cloud* (<https://www.ezbiocloud.net/>) apresentadas na Tabela 4. O valor de corte para essa análise foi de 70% de similaridade.

Tabela 4: Tabela com as estirpes oriundas do EZBio *Cloud* utilizadas na análise DNA-DNA *in silico* da ferramenta GGDC.

<i>Aeromonas</i> espécie	Estirpe
<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	CECT 4199
<i>Aeromonas aquatica</i>	AE235
<i>Aeromonas australiensis</i>	CECT 8023
<i>Aeromonas bestiarum</i>	CECT 4227
<i>Aeromonas bivalvium</i>	CECT 7113
<i>Aeromonas caviae</i>	CECT 838
<i>Aeromonas dhakensis</i>	CIP 107500
<i>Aeromonas diversa</i>	ATCC 43946
<i>Aeromonas encheleia</i>	LMG 16331
<i>Aeromonas enteropelogenes</i>	CECT 4487
<i>Aeromonas eucrenophila</i>	CECT 4224
<i>Aeromonas finlandensis</i>	4287D

Continuação da tabela 4

<i>Aeromonas</i> espécie	Estirpe
<i>Aeromonas fluvialis</i>	LMG 24681
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	ATCC 7966
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>Ranae</i>	LMG 19707
<i>Aeromonas jandaei</i>	CECT 4228
<i>Aeromonas lacus</i>	AE122
<i>Aeromonas media</i>	CECT 4232
<i>Aeromonas molluscorum</i>	848
<i>Aeromonas piscicola</i>	LMG 24783
<i>Aeromonas popoffii</i>	CIP 105493
<i>Aeromonas rivuli</i>	DSM 22539
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i>	NBRC 13784
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>pectinolytica</i>	34mel
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	ATCC 33658
<i>Aeromonas sanarellii</i>	LMG 24682
<i>Aeromonas schubertii</i>	CECT 4240
<i>Aeromonas simiae</i>	IBS S6874
<i>Aeromonas sobria</i>	ATCC 43979
<i>Aeromonas taiwanensis</i>	LMG 24683
<i>Aeromonas tecta</i>	CECT 7082
<i>Aeromonas veronii</i>	CECT 4257

Outras análises foram empregadas, pelo uso do servidor JSpeciesWS v3.8.3, foram: avaliação da identidade média de nucleotídeos, do inglês, *Average Nucleotide Identity* (ANI) v3.8.3 e correlação de tetranucleotídeo, do inglês, *Tetra Correlation Search* (TCS) v3.8.3 usando o genoma AE59-TE2 contra o banco de dados do próprio servidor (Richter *et al.*, 2016).

Para uma análise mais robusta da classificação taxonômica, a técnica de *multilocus sequence analysis* (MLSA) foi empregada. Para isso, foi pesquisado na literatura os genes de manutenção (HK, do inglês *Housekeeping genes*) utilizados para o

gênero *Aeromonas*. Dentre eles foram utilizados: *recA*, *gyrB*, *gltA*, *metG*, *groL* e 16S rRNA (Colston *et al.*, 2014). As estirpes utilizadas para gerar a árvore filogenética estão apresentadas na Tabela 5. Como grupo externo para enraizar a árvore, foi utilizado o genoma *Oceanimonas doudoroffi* ATCC 27123. Todos os genomas foram anotados com a ferramenta *Rapid Prokaryotic Genome Annotation* (PROKKA) v1.14.6 (Seemann, 2014) e as sequências de cada gene foram concatenadas para construir “supergenes” (aproximadamente 14 kbp). Foi realizado um alinhamento múltiplo de sequências, no qual as lacunas (GAPS) foram removidas manualmente com a ferramenta BioEdit v7.2.5 (Hall *et al.*, 1999). As análises filogenéticas foram feitas usando o software MEGA11 (Tamura *et al.*, 2021). Uma árvore filogenética foi inferida usando o método Máxima verossimilhança (ML do inglês, *Maximum Likelihood*) e o modelo *General Time Reversible* (GTR). A distribuição gamma discreta foi usada para modelar diferenças de taxa evolutiva entre sítios, permitindo que alguns sítios fossem evolutivamente invariáveis. O teste de *bootstrap* foi realizado com 1000 réplicas.

Tabela 5: Genomas das estirpes tipo do gênero *Aeromonas* utilizadas na análise MLSA para gerar a árvore filogenética. Para todos os genomas foi adicionada a informação do identificador do NCBI.

Estirpe Tipo	NCBI ID
<i>A. allosaccharophila</i> CECT 4199	GCA_000819685.1
<i>A. aquatica</i> AE235	GCA_000764655.1
<i>A. australiensis</i> CECT 8023	GCA_000819725.1
<i>A. bestiarum</i> CECT 424227	GCA_000819745.1
<i>A. bivalvium</i> CECT 7113	GCA_000819765.1
<i>A. caviae</i> CECT 838	GCA_018360005.1
<i>A. dhakensis</i> CIP 1077500	GCF_000820305.1
<i>A. diversa</i> CECT 4254	GCA_000819805.1
<i>A. encheleia</i> CECT 4342	GCA_000819825.1
<i>A. enteropelogenes</i> CECT 4487	GCA_000819845.1
<i>A. eucrenophila</i> CECT 4224	GCA_000819865.1
<i>A. finlandensis</i> 4287 CECT 8028T	GCA_000764645.1
<i>A. fluvialis</i> LMG 24681	GCA_000819885.1

Continua

Continuação da Tabela 5

Estirpe Tipo	NCBI ID
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> ATCC 7966	GCA_000014805.1
<i>A. jandaei</i> CECT 4228	GCA_000819955.1
<i>A. lacus</i> AE122	GCA_000764665.1
<i>A. media</i> CECT 4232	GCA_000819985.1
<i>A. piscicola</i> LMG 24783	GCA_000820005.1
<i>A. popoffii</i> CIP 105493	GCA_000820025.1
<i>A. rivuli</i> DSM 22539	GCA_020149575.1
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i> NBRC 13784	GCA_000647955
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>pectinolytica</i> 34mel	GCA_002735225.1
<i>A. sanarellii</i> LMG 24682	GCA_000820085.1
<i>A. simiae</i> CIP 107798	GCA_000820125.1
<i>A. sobria</i> CECT 4245	GCA_000820145.1
<i>A. taiwanensis</i> LMG 24683	BAWK01000004
<i>A. tecta</i> CECT 7082	GCA_000820185.2
<i>A. veronii</i> CECT 4257	GCA_000820225
<i>Oceanimonas doudoroffi</i> ATCC 27123	GCA_002242685.1

2.2.5 Potencial de virulência e resistência a antibióticos

Além da busca por substâncias antimicrobianas, também foi realizada a análise em busca de fatores de virulência. Há relatos na literatura de bacteriocinas com características típicas de fatores de virulência, servindo para facilitar a disseminação e replicação na célula hospedeira (Śmiałek *et al.*, 2021; Vidal Amaral *et al.*, 2022). Para verificar o potencial de virulência da cepa AE59-TE2, a ferramenta ABRicate versão 1.0.1 (Liu *et al.*, 2019) foi utilizada com o banco de dados de fatores de virulência, *Virulence Factor Database* (VFDB).

Para verificar o perfil de resistência aos antibióticos, as ferramentas utilizadas foram: a ferramenta do NCBI *Antimicrobial Resistance Gene Finder Plus* (AMRFinderPlus) v3.10.23 (Feldgarden *et al.*, 2021); a ferramenta *Resistance Finder* (ResFinder) v4.0 (Bortolaia *et al.*, 2020) e a ferramenta *Resistance Gene Identifier* (RGI) v.5.2.0 do *Comprehensive Antibiotic Resistance Database* (CARD) v. 3.1.4 (Alcock *et al.*, 2020).

2.2.6 Anotação Funcional e visualização do genoma

Para realizar a anotação funcional do genoma da estirpe AE59-TE2 foram utilizadas duas ferramentas: o servidor *SEED and The Rapid Annotation of Microbial Genome using Subsystems Technology* (RAST) v2.0 classic (Overbeek *et al.*, 2014); a ferramenta *Rapid Prokaryotic Genome Annotation* (PROKKA) v1.14.6 (Seemann, 2014) e a ferramenta *Pathosystems Resource Integration Center* (PATRIC) v.3.6.9 (Brettin *et al.*, 2015; Davis *et al.*, 2020). Além disso, as ferramentas *KEGG Automatic Annotation Server* (KAAS) (Moriya *et al.*, 2007) e *KEGG Mapper Reconstruction* (Kanehisa & Sato, 2020) foram utilizadas para fazer atribuições de ortologia e então fazer o mapeamento de vias metabólicas, os gráficos dessa análise foram gerados pela ferramenta R (R Core Team, 2022). O gráfico do genoma circular foi feito com a ferramenta *Circular Genome Viewing* (CGView) (Grant & Stothard, 2008).

2.2.7 Busca de genes/proteínas relacionadas à produção de substâncias antimicrobianas

Para realizar a busca de genes relacionados com a produção de substâncias antimicrobianas, algumas ferramentas foram implementadas.

Foi realizada uma análise com a ferramenta *Antibiotics and Secondary Metabolite Analysis Shell* (AntiSMASH) v6.0.1 (Medema *et al.*, 2011; Blin *et al.*, 2021; <https://antismash.secondarymetabolites.org/#!/start>) para verificar o metabolismo secundário e a busca de bacteriocinas. Além disso, a ferramenta GO FEAT (Araújo *et al.*, 2018) foi utilizada para fazer o enriquecimento dos dados genômicos e buscar as seguintes palavras-chaves relacionadas às atividades antimicrobianas: bacteriocina, antibiótico, colicina, microcina, endopeptidase, endonuclease, policetídeos (PKS) e ramnolipídios.

A ferramenta BLASTp v.2.11.0+, última atualização 03/11/2020 (Altschul *et al.*, 1990) foi utilizada para buscar proteínas relacionadas à produção de substâncias antimicrobianas. Os bancos de dados utilizados foram: *Bacteriocin Genome Mining tool* (BAGEL) classe III com a versão mais atual do banco de dados, atualizado no dia 21 de dezembro de 2021 (Van Heel *et al.*, 2013); BACTIBASE com a última atualização do banco de dados realizada no dia 20 de maio de 2017 (Hammami *et al.*, 2010); DoBiscuit *Database of BioSynthesis cluster CUrated e InTegrated* (Ichikawa *et al.*, 2013; <https://www.nite.go.jp/nbrc/pks/>) e algumas proteínas relacionadas à produção de bacteriocinas, como a colicina V (CvaC) e zoocina A (ZooA) oriundos do banco de dados

do servidor UniProt (UniProt consortium, 2021). Foi utilizada a anotação do genoma (fasta aminoácido) com a ferramenta *Rapid Prokaryotic Genome Annotation* (PROKKA) v1.14.6 (Seemann, 2014) para realizar essa análise.

Após encontrar sequências de interesse, foi realizado um alinhamento múltiplo entre quatro sequências encontradas no genoma da estirpe AE59-TE2 semelhantes a proteína de produção de zoocina A, com a sequência de proteína relacionada a produção de zoocina A do banco de dados do servidor UniProt (Uniprot/número de Acesso: O54308) com a ferramenta Clustal Omega v1.2.4 (Sievers *et al.*, 2011).

*Artigo
publicado*

Article

Aeromonas allosaccharophila Strain AE59-TE2 Is Highly Antagonistic towards Multidrug-Resistant Human Pathogens, What Does Its Genome Tell Us?

Sheila da Silva ¹, Fernanda Alves de Freitas Guedes ¹, João Ricardo Vidal Amaral ¹, José Roberto de Assis Ribeiro ¹, Yuri Pinheiro Alves de Souza ², Ângela Correa de Freitas-Almeida ³, Fabiano Lopes Thompson ⁴, Rommel Thiago Jucá Ramos ⁵, Andrew Steven Whiteley ⁶, Andrew Macrae ^{1,7}, and Selma Soares de Oliveira ^{1,7,*}

- ¹ Programa Pós-Graduação de Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Prof. Rodolpho Paulo Rocco, s/n-Prédio do CCS-Bloco K, 2° Andar-Sala 032, Rio de Janeiro 21941-902, Brazil
 - ² Helmholtz Zentrum Munchen COMI, Research Unit Comparative Microbiome Analysis, 85764 Neuherberg, Germany
 - ³ Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Centro Biomédico, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Av. 28 de Setembro, 87, 3° Andar, Fundos, Vila Isabel, Rio de Janeiro 20550-170, Brazil
 - ⁴ Departamento de Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Prof. Rodolpho Paulo Rocco, s/n-Prédio do CCS-Instituto de Biologia, 2° Andar-Sala 93, Rio de Janeiro 21941-970, Brazil
 - ⁵ Instituto de Ciências Biológicas, Centro de Genômica e Biologia de Sistemas da Universidade Federal do Pará (UFPA), Rua Augusto Corrêa, 01 Guamá, Belém 66075-970, Brazil
 - ⁶ Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO), Canberra, ACT 2601, Australia
 - ⁷ Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Prof. Rodolpho Paulo Rocco, s/n-Prédio do CCS-Bloco I, 1° Andar-Sala 047, Rio de Janeiro 21941-902, Brazil
- * Correspondence: selma@micro.ufrj.br; Tel.: +55-21-3938-6739



Citation: Silva, S.d.; Guedes, F.A.d.F.; Amaral, J.R.V.; Ribeiro, J.R.d.A.; Souza, Y.P.A.d.; Freitas-Almeida, Â.C.d.; Thompson, F.L.; Ramos, R.T.J.; Whiteley, A.S.; Macrae, A.; et al. *Aeromonas allosaccharophila* Strain AE59-TE2 Is Highly Antagonistic towards Multidrug-Resistant Human Pathogens, What Does Its Genome Tell Us? *Life* **2022**, *12*, 1492. <https://doi.org/10.3390/life12101492>

Academic Editors: Milan Kolar and Pabulo H. Rampelotto

Received: 30 August 2022

Accepted: 19 September 2022

Published: 26 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Multidrug-resistant bacteria are of critical importance and a problem for human health and food preservation; the discovery of new antimicrobial substances to control their proliferation is part of the solution. This work reports on 57 antagonistic *Aeromonas* strains, of which 38 strains were antagonistic towards problematic human pathogens. The genome of the most antagonistic strain was sequenced and identified as *Aeromonas allosaccharophila*. Its genome was fully annotated and mined for genes that might explain that activity. Strain AE59-TE was antagonistic toward clinically relevant gram-negative and gram-positive multidrug-resistant bacteria, including *Klebsiella pneumoniae* KPC, *Escherichia coli* ESBL, *Salmonella typhimurium*, and *Staphylococcus aureus* MRSA. Strain AE59-TE2 was identified by multilocus sequence analysis. Genome mining identified four genes homologous to the bacteriocin, zoocin A from *Streptococcus equi* and a gene 98% similar to *cvpA* linked to colicin V production. *A. allosaccharophila* strain AE59-TE2 produced antimicrobial activity against a broad range of bacteria, including important gram-negative bacteria, not typically targeted by bacteriocins. Here we described novel zoocin genes that are promising for industrial applications in the food and health sectors. Interesting and important antagonistic activity is described combined with the first detailed genomic analysis of the species *Aeromonas allosaccharophila*.

Keywords: *Aeromonas allosaccharophila*; antimicrobial activity; bacteriocins; antimicrobial resistance; genomics

1. Introduction

Multidrug-resistant bacteria cause persistent hospital infections that increase morbidity and mortality, especially in developing countries [1,2]. Their impact on health care systems is mostly due to the unavailability of effective antibiotics [1]. The main nosocomial antibiotic-resistant pathogens are *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*,

extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Klebsiella pneumoniae*, carbapenem-resistant *Enterobacterales* (CRE), and vancomycin-resistant *Enterococci* (VRE) [1,3,4]. Antimicrobial resistance is the ability of microorganisms to inactivate or decrease the effectiveness of antibiotics. Resistance can occur spontaneously due to genetic modifications; nonetheless, this process can be accelerated by the inappropriate use of antibiotics, resulting in evolutionary pressures for genetic mutations and the exchange of genetic material between bacteria and phages [5]. Since the discovery of antibiotics, between 1930–1962, more than 20 new classes have been described. However, resistance continues to evolve, and the search for new antimicrobial compounds is an urgent challenge [5]. Only three new classes of antibiotics against gram-positive bacteria have been described recently: the Oxazolidinones class with Linezolid (2001) and tedizolid (2014); the daptomycin class, consisting of cyclic lipopeptides, discovered in 2006; and the fidaxomicin class, a macrocycle drug, discovered in 2011 [5].

Bacteria are a source of many antimicrobial compounds. They produce lipopeptide, comprising non-ribosomal peptides synthetases (NRPSs), such as circular lipopeptides (surfactin, iturine, and phengycine families), polyketide (PKS) compounds, and siderophores [6]. Some of these compounds are products of secondary metabolism, such as antibiotics, while others are bioactive molecules ribosomally synthesized, such as antimicrobial peptides and bacteriocins. Bacteriocins are viable alternatives to antibiotics that are no longer effective due to antimicrobial resistance [7,8]. Traditional bioprospecting strategies for new antibiotics are not efficient in finding new substances [9]. Since traditional methods for screening antimicrobial substances can last a long time and have high costs, genomic analyses provide a new opportunity to search these substances in a more practical and less expensive way. Genome sequencing, gene annotation, and the activation of silent gene clusters constitute the basis of new methods for massive screening and new antibiotics discovery and yet success is limited [9].

Aeromonas strains are known to produce several antimicrobial substances with the potential to become new antibiotics and therefore are worthy of detailed genomic investigations. The *Aeromonas* genus comprises gram-negative, facultative anaerobic bacteria often found in aquatic environments [10], the human gastrointestinal tract, and other animals, including fish, reptiles, and amphibians [10–12]. *Aeromonas* species can cause several animal diseases. Furunculosis, for example, is a condition observed in fish [13], which is associated with significant economic losses in pisciculture [11,12,14]. Many *Aeromonas* virulence genes have already been reported: *vapA* (layer A); *act*, *alt*, and *ast* (cytotoxic enterotoxins); *ahyB* (elastase); *exu* (DNases) [15,16]. *Aeromonas* strains are considered opportunistic pathogens, infecting mainly immunosuppressed patients [11,12,17]. Although there are reports correlating *Aeromonas* sp. to gastroenteritis and few cases of more severe infections, the etiological role of the genus in this pathogenicity remains controversial [17,18]. The World Health Organization's "One-World-One Health" concept highlights that healthiness is based on a balance of human, animal, microbe and environmental interactions [19]. In this manner, solutions to these problems are likely to be found in nature. Antagonistic interactions are continually observed and are a part of nature, and are in natural environments. This concept was a guide for the research presented in this article. Bacteriocins receive special focus because they possess great potential in preventing the spread of infectious bacteria, controlling spoilage of industrialized products, and mitigating the indiscriminate and excessive use of other antibiotics [20].

There are numerous reports on *Aeromonas* strains producing bacteriocin-like substances (BLS) [21,22]. However, to date, the activity and presence of BLS has not been linked to its genetic origin. Antimicrobial peptides are important compounds for microorganisms, which grant competitiveness in different environments [23]. These molecules are synthesized by several organisms for their defense. Amongst these are peptides called bacteriocins, which can kill or inhibit the growth of other microorganisms [7]. Bacteriocins from gram-positive bacteria are frequently described as inhibiting other gram-positive strains [24]. However, important gram-negative pathogens, such as *Salmonella* and *Es-*

cherichia coli, have not yet been targeted by bacteriocins [25,26]. Thus, there is a need to discover and report on bacteriocins that target gram-negative disease-causing bacteria.

Biotechnological applications of bacteriocins include their use as antibiotics, food preservatives and bacteriocin, such as Nisin, used by food industries [8,23]; and as probiotics [27]. Bacteriocins may also have applications as anticancer agents [7,24]. There are new assays that use bacteriocins in agriculture for the biocontrol of phytopathogens [8]. Colicin is used for the biocontrol of pests in tobacco plants and considered an efficient strategy that meets GRAS (FDA) safety protocols for controlling bacteria [28]. Bacteria from aquatic environments have already been described as great candidates for the production of antimicrobial substances. The *Aeromonas* genus has been reported as capable of producing bacteriocins. This is an interesting genus, since it is found either in animal, water, or human, which requires a certain level of adaptation to different niches, where bacteriocins and toxins may play a role in the competition and maintenance of those species in respective niches [29]. Therefore, our work aimed to isolate *Aeromonas* bacteria from fish to investigate the antimicrobial substances' production and to perform the genomic characterization of the producing strain. Here are described the bioprospecting and screening of a wide range of wild *Aeromonas* strains looking for novel antagonistic behavior, followed by genomic mining to search for genes related to bacteriocins and antimicrobial activity.

2. Materials and Methods

2.1. Sample Collection and Isolation

Aeromonas strains were isolated from healthy fish branchiae, scales, and cloaca. Two replicates were taken for *Mugil brasiliensis* (popular names: Tainha/Mullet) and three replicates for *Caranx latus* (popular name: Xerelete), which were purchased at a street market located in Rio de Janeiro city, RJ, Brazil (−22.910468, −43.240857). A total of 200 mL of water was collected from six different lagoon points at the Rodrigo de Freitas Lagoon (latitudes 43°11'09" N and 43°13'03" S, and longitudes 022°57'02" E and 022°58'09" W). Water samples were centrifuged at 12,100× g for 15 min and the pellet was used to isolate *Aeromonas*. One *Aeromonas* strain previously isolated from lettuce leaves [30] was also screened for antagonistic activity in this bioprospection. All the samples collected were incubated in alkaline peptone water (APA) at 30 °C for 24 h and were inoculated at 30 °C for 48 h in selective medium glutamate starch phenol (GSP) red agar (Merck, Darmstadt, Germany). The *Aeromonas* sp. strains were then examined and classified into phenospecies using the criteria described in the literature [12,31].

2.2. Antimicrobial Activity Screening

A total of 57 *Aeromonas* strains were screened for antimicrobial activity by either the agar well diffusion assay [32] or the chloroform method [33] with modifications (Supplementary Figure S1). Both experiments were performed in triplicate. Bacteria were grown on nutrient agar and were incubated at 28 °C. Inhibition halos greater than 1 cm were considered as positive results for antimicrobial activity. *Klebsiella pneumoniae* KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), *K. pneumoniae* ESBL (extended-spectrum β-lactamase-producing), *K. pneumoniae* ATCC 13883, *Escherichia coli* ESBL, *Enterobacter cloacae* NDM (New Delhi metallo-beta-lactamase), *Acinetobacter baumannii*, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa*, and *P. aeruginosa* strains SPM (São Paulo metallo-β-lactamase) from Laboratory of Medical Investigation; *E. coli*, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *P. aeruginosa* ATCC 15422 from Laboratory of Food Microbiology and *K. pneumoniae* 19ae, *Enterococcus faecalis* 5ae, *S. aureus* HIV 86a, and *S. aureus* HIV 87a from the Laboratory of Nosocomial Infection were used as indicator strains. These strains were selected because they can be etiological agents of severe diseases and are multidrug resistant. The presence (value 1) or absence (value 0) of antimicrobial activity was converted into a table and used to build a hierarchical clustering with the GenePattern online tool [34] using its default values. Strain AE59-TE2 exhibited the broadest antimicrobial activity spectrum and was selected for genome sequencing and mining.

2.3. DNA Extraction, Illumina Sequencing, Data Preprocessing, and Genome Assembly

Genomic DNA was extracted and purified using the CTAB method [35]. The AE59-TE2 paired-end (2×300 bp) library was constructed from approximately 1 μ g of gDNA using the Nextera XT DNA Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) and sequenced with the MiSeq Illumina platform (Rio de Janeiro, Brazil). Trimmomatic v0.36 [36] was used for quality control and to trim the sequences using default parameter values to remove adaptors and N-containing reads, as well as small (<36 bp) reads. SPAdes v3.10.1 [37] was used for a de novo assembly, and contigs were mapped twice with the MeDuSa v1.6 server [38] using 6 *A. veronii* complete genomes (GCA_001634325.1, GCA_001593245.1, GCA_001634345.1, GCA_002803925.1, GCA_002803945.1, and GCA_000204115.1) as reference, being the closest species and with the most complete genomes deposited on NCBI. To evaluate the assembly's quality, filtered reads were aligned to the AE59-TE2 scaffolds using BWA v0.7.75a [39] and the statistics were obtained with Qualimap v2.2.1 [40]. CheckM v1.4.0 [41] was used to verify genome completeness and contamination, and QUAST v5.0.2 [42] was used to verify the genome quality. A flowchart summarizing the assembly steps is shown in Supplementary Figure S2. The AE59-TE2 sequenced library and the genome final assembly were deposited at the NCBI database under BioSample accession numbers SAMN08436981.

2.4. Taxonomic Identification by Molecular Methods

Multiple methods were used for species identification: 16S rRNA gene sequencing and phylogenetic analysis with BLAST server v.2.12.0 [43], multilocus sequence analysis (MLSA), in silico DDH using the Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC) v2.1 server [44] were performed. In silico DDH analyses, using 33 *Aeromonas* Type strains (Supplementary Table S1) obtained from the EZBio Cloud database (<https://www.ezbiocloud.net/> accessed on 18 September 2022) were made with a cutoff value of 70% of similarity. MLSA was conducted with six housekeeping genes (*recA*, *gyrB*, *gltA*, *metG*, *groL*, and 16S rRNA) [45] from *A. allosaccharophila* CECT 4199, *A. aquatica* AE235, *A. australiensis* CECT 8023, *A. bestiarum* CECT 424227, *A. bivalvium* CECT 7113, *A. caviae* CECT 838, *A. dhakensis* CIP 1077500, *A. diversa* CECT 4254, *A. encheleia* CECT 4342, *A. enteropelogenes* CECT 4487, *A. eucrenophila* CECT 4224, *A. finlandensis* 4287, *A. fluvialis* LMG 24681, *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* ATCC 7966, *A. jandaei* CECT 4228, *A. lacus* AE122, *A. media* CECT 4232, *A. piscicola* LMG 24783, *A. popoffii* CIP 105493, *A. rivuli* DSM 22539, *A. salmonicida* subsp. *masoucida* NBRC 13784, *A. salmonicida* subsp. *pectinolytica* 34mel, *A. sanarellii* LMG 24682, *A. simiae* CIP 107798, *A. sobria* CECT 4245, *A. taiwanensis* LMG 24683, *A. tecta* CECT 7082, and *A. veronii* CECT 4257. *Oceanimonas doudoroffii* ATCC 27123 was used as an outgroup. All genomes were annotated with the Rapid Prokaryotic Genome Annotation (PROKKA) tool v1.14.6 [46]. For the multilocus sequence analysis, sequences of each gene were concatenated to construct "supergenes" (approximately 14 kbp). They were then multiple aligned and gaps were removed using BioEdit v7.2.5 [47]. Phylogenetic analyses were conducted using MEGA11 software [48]. A phylogenetic tree was inferred using the Maximum Likelihood (ML) method and General Time Reversible (GTR) model. A discrete Gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites, allowing for some sites to be evolutionarily invariable. The bootstrap test was performed using 1000 replicates. The taxonomic classification was corroborated by the Average Nucleotide Identity (ANI) v3.8.3 and Tetra Correlation Search (TCS) v3.8.3 analyses using the AE59-TE2 genome against GenomesDB in JSpeciesWS server v3.8.3 [49]. ANIb result was shown by heatmap using R tool [50].

2.5. Virulence Potential and Antibiotic Resistance

The search for virulence factors is important, as there are already reports of bacteriocins with typical characteristics of virulence factors, thus making dissemination and replication in the host cell easier [29,51]. The virulence potential of the AE59-TE2 strain was evaluated using the virulence factors database (VFDB) from the ABRicate tool version 1.0.1 [52].

NCBI Antimicrobial Resistance Gene Finder Plus (AMRFinderPlus) tool v3.10.23 [53], ResFinder v 4.0 [54], and Resistance Gene Identifier (RGI) v.5.2.0 from Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) v. 3.1.4 [55] were used to verify the antibiotic resistance profile.

2.6. Genome Functional Annotation and Mining

Gene prediction and functional annotation were carried out using the classic RAST v2.0 server [56] and Rapid Prokaryotic Genome Annotation (PROKKA) tool v1.14.6 [46]. To search for more genes related to bacteriocin production, BAGEL (class III), Bactibase, and DoBiscuit-Database of BioSynthesis cluster Curation and InTegrated (<https://www.nite.go.jp/nbr/pks/> accessed on 18 September 2022) [57] and some genes for the Colicin V production protein (*cvaC*) and Zoocin production protein (ZooA) from UniProt were used with BLASTp v.2.11.0+ [42] against the PROKKA genome annotation. Four zoocin-like sequences from the AE59-TE2 genome and 1 zoocin A sequences from UniProt (accession number: O54308) was multiple aligned with Clustal Omega v1.2.4 [58]. Analysis with AntiSMASH v6.0 was performed to verify secondary metabolism and search for bacteriocins [59]. The GO FEAT tool [60] was used for functional annotation and enrichment of genomic data. The KEGG Automatic Annotation Server (Kaas) [61] and KEGG Mapper Reconstruction were used to make orthology assignments and pathway mapping. To perform a better characterization of the genome, the Pathosystems Resource Integration Center (PATRIC) v.3.6.9 was used [62], and the GO Feat tool was used to search for keywords that are related to antimicrobial activities, such as the words: Bacteriocin, Antibiotic, Colicin, Microcin, Endopeptidase, Endonuclease, polyketides (PKS), and Rhamnolipid. The circular genome plot was made with the Circular Genome Viewing (CGView) tool [63].

3. Results

3.1. Sample Identification and Phenotypic Characterization of Antibacterial Activity of *Aeromonas* Isolates

Forty-one *Aeromonas* strains were isolated from fish samples. Preliminary biochemical tests identified the samples as *A. hydrophila* (n = 21), *A. caviae* (n = 14), and *A. veronii* bv *sobria* (n = 6). Fifteen *Aeromonas* strains were isolated from the water sample and identified as *A. caviae* (n = 8), *A. hydrophila* (n = 4), *A. veronii* bv *sobria* (n = 2), and *A. salmonicida* (n = 1). Another *Aeromonas* strain previously isolated from lettuce was identified as *A. caviae* [30]. Among the 57 strains tested, 38 demonstrated differing levels of antimicrobial activity towards at least one highly pathogenic bacterial strain (Figure 1). A hierarchical cluster analysis was performed to visualize the results for antimicrobial activity. The analysis revealed a group of seven strains (AE04, AE34, AE43, AE31, AE45, AE54, and AE59-TE2) with a similar profile, broadly inhibiting both gram-negative and gram-positive multidrug-resistant pathogens. Strain AE59-TE2 exhibited antimicrobial activity towards 14 of the 16 indicator strains, namely *K. pneumoniae* (KPC, ESBL, 19ae ATCC 13883), *E. coli* and *E. coli* ESBL, *E. cloacae* NDM, *A. baumannii*, *S. typhimurium* ATCC 14028, *S. aureus* (ATCC 6538, HIV 86a, and HIV 87a), *E. faecalis* 5ae, and *P. aeruginosa* (Figure 1). Supplementary Figure S1 shows the inhibition zones produced against the *E. coli* ESBL strain.

3.2. AE59-TE2 Genome Sequencing and Assembly

Illumina MiSeq paired-end sequencing of the AE59-TE2 library yielded 532,201 raw reads. After preprocessing steps, 365,719 (68.72%) quality reads were obtained (Supplementary Table S2). De novo genome assembly generated 109 contigs (Table 1) and the mapping genome assembly resulted in one scaffold with a total sequence length of 4,498,261 bp and 58.68% G + C content in the QUAST result (Figure 2). CheckM analysis resulted in 100% completeness and 0.29% of contamination. More than 99% of the reads aligned to the assembled AE59-TE2 scaffolds, with a mean coverage of 23.42. Six AE59-TE2 scaffolds (scaffold_10, scaffold_20, scaffold_22, scaffold_26, scaffold_28, and scaffold_35) generated a consensus sequence (549 bp) that putatively encodes for a transposase (data not shown).

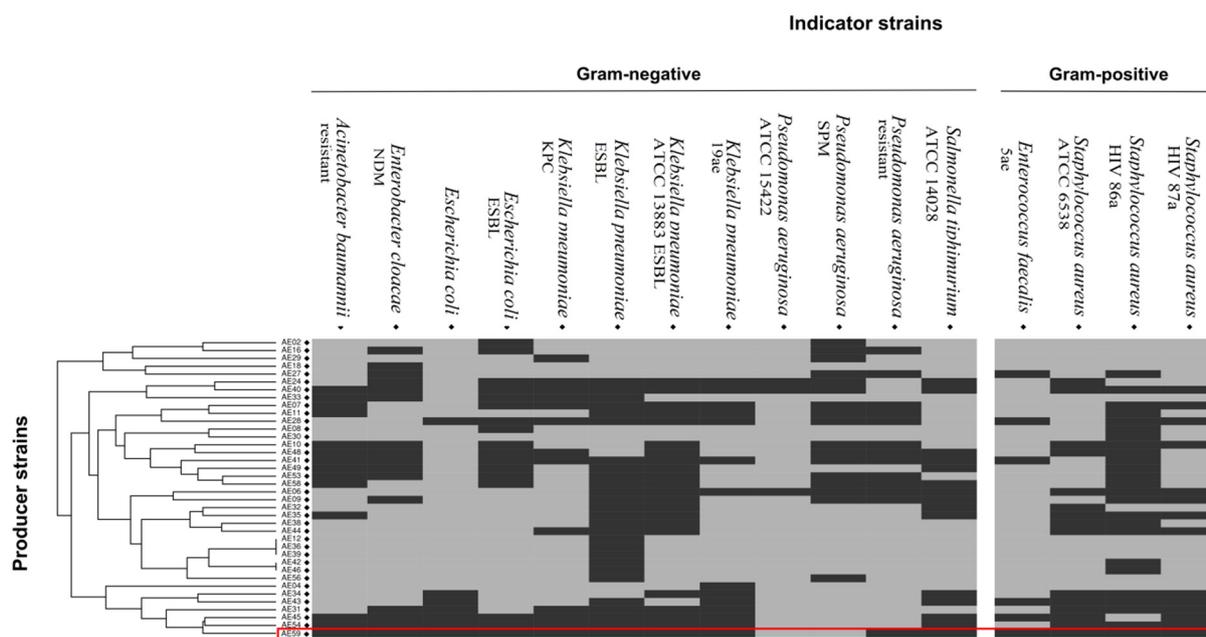


Figure 1. Antimicrobial activity tests using *Aeromonas* sp. producer strains against clinical and potentially pathogenic indicator strains. The results of the antimicrobial activity tests were converted into positive (1) and negative (0) antimicrobial activity. A table of this data was used as an input for a hierarchical clustering. The numerical values were then converted into a color-code, where dark grey indicates that an inhibitory activity was observed.

Table 1. AE59-TE2 genome assembly statistics. These values represent the main output of each assembly step, starting with the de novo assembly carried out with SPAdes software and followed by two runs of scaffolding conducted with the Medusa online server and *A. veronii* complete genomes as references. The result generated after the second scaffolding run represents the final AE59-TE2 assembly. A flowchart of assembly steps is shown in Supplementary Figure S2.

Statistics	De Novo Assembly	Scaffolding 1	Scaffolding 2
Number of sequences	109	62	51
Largest contig (bp)	473,819	3,152,962	4,498,261
Average length (bp)	41,433.55	72,878.34	88,608.96
Total length (bp)	4,516,257	4,518,457	4,519,057
% GC	58.65	58.63	58.62
N50	263,685	3,152,962	4,498,261

3.3. AE59-TE2 Species Identification and *Aeromonas* Taxonomy

Via BLAST and the nr database at the NCBI, the AE59-TE 16S rRNA sequence was highly similar to *Aeromonas allosaccharophila* (accession number: FJ940841.1; 100% identity and 99% query coverage) and *A. veronii* (accession number: CP024933.1; 99% identity and 100% query coverage). Since 16S rRNA analyses are not gold standard for species-level identification in the *Aeromonas* genus, MLSA, DDH in silico, and ANI analyses were performed. The MLSA phylogenetic tree inference grouped the AE59-TE2 strain and *A. allosaccharophila* together (Figure 3). DDH in silico analysis demonstrated that the *A. allosaccharophila* reference genome from EZBio Cloud database (Supplementary Table S3) was the most similar to the AE59-TE2 strain, DDH 62.6%. ANI analysis resulted in a score of 95.01% for type strain *A. allosaccharophila* CECT 4199 (Figure 4). TCS analysis resulted in a score of 0.99965 for *A. allosaccharophila* TTU2014-159ASC and a score of 0.99943 for type strain *A. allosaccharophila* CECT 4199. Analyses of the 16S rRNA gene, MLSA, DDH in silico, and ANI strongly indicate that the AE59-TE2 strain belongs to the *A. allosaccharophila* species cluster.

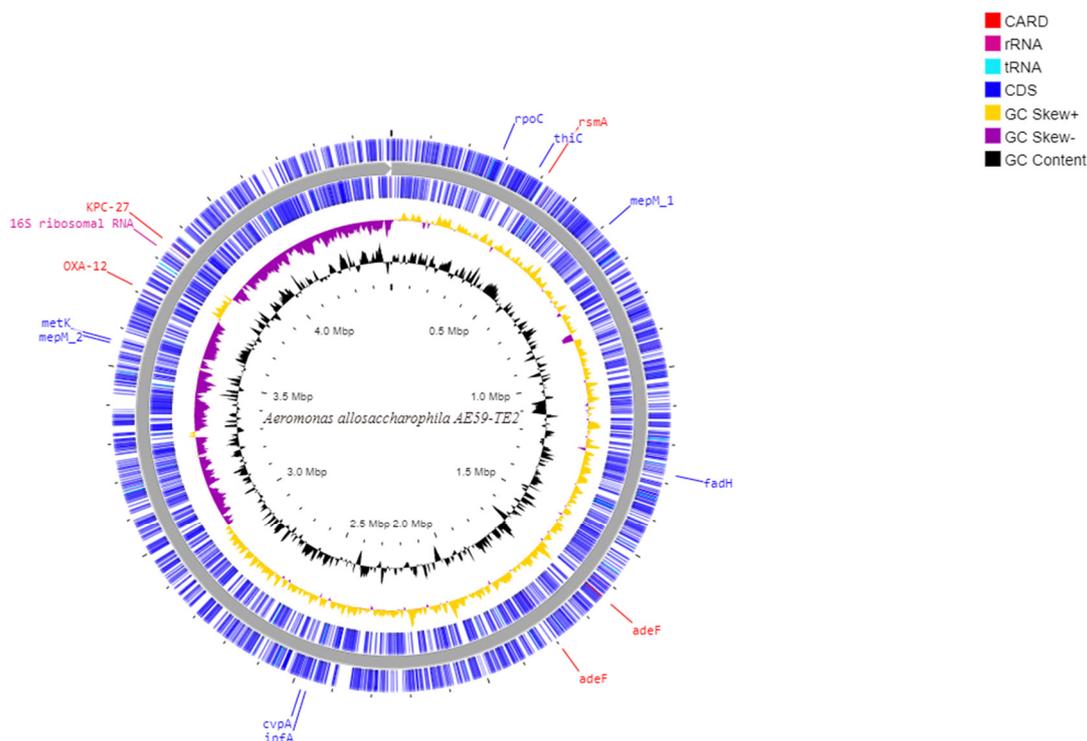


Figure 2. Schematic circular diagram of the AE59 genome highlighting the main sequences cited in the text. From the most external circle inwards: first and Second (blue)-CDS in positive strand; and negative strand; The purple circle is a GC-skew in negative strand and in yellow is a GC-skew in a positive strand; the black circle is a G + C content. The genes annotated with the CARD tool are marked with red; rRNA are marked with pink and the tRNA are marked with light blue.

3.4. Virulence Potential and Antimicrobial Resistance

The virulence factors database (VFDB) identified 36 genes with identities above 90% and 88 genes with identities between 80–89% (Supplementary Table S4). Type III secretion system (T3SS) structural genes were identified (*ascV* and *ascC* genes), but only one gene of the main effectors was found (*aopH*). The ResFinder database did not identify any resistance genes in the AE59-TE2 genome. However, the AMRFinderPlus tool identified three genes: *blaOXA* (OXA-12 family class D beta-lactamase) with 98.11% identity and 100% coverage; *arsD* (arsenite efflux transporter metallochaperone) with 47.89% identity and 100% coverage; and *arsC* (glutaredoxin-dependent arsenate reductase) with 77.86% identity and 99.29% coverage. CARD/RGI annotated four strict hits. Two genes related to the resistance-nodulation-cell division (RND) antibiotic efflux pump: the *rsmA* gene with 92.73% identity; and *adeF* with 48.56% identity. A gene related to OXA beta-lactamase (antibiotic inactivation): the OXA-726 with 95.45% identity. A gene related to elfamycin antibiotic (antibiotic target alteration), *Escherichia coli* gene EF-Tu mutants conferring resistance to Pulvomycin with 88.8% identity. This latter gene was annotated as a *tufI* gene with 99.5% identity in the UniProt database and functions promoting the GTP-dependent binding of aminoacyl-tRNA to the A-site of ribosomes during protein biosynthesis.

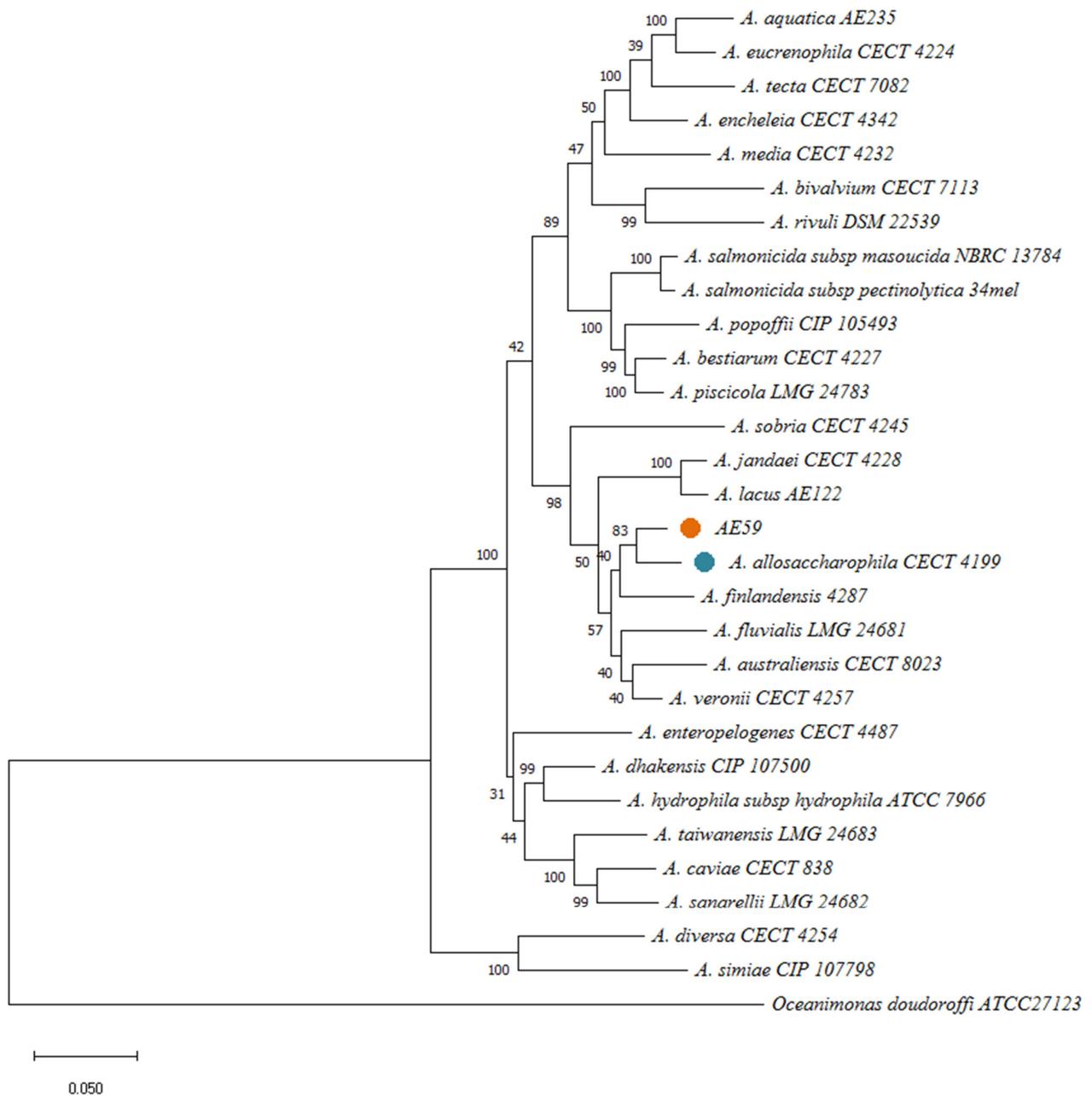


Figure 3. MLSA resultant phylogenetic tree, using six housekeeping genes: *recA*, *gyrB*, *gltA*, *metG*, *groL*, and *16S rRNA* and 28 genomes from *Aeromonas* genus, inferred with Maximum Likelihood (ML) method and General Time Reversible model. The model evolutionary used was a discrete Gamma distribution. The bootstrap consensus was inferred from 1000 replicates. *Oceanimonas doudoroffi* ATCC 27123 was used as an outgroup.

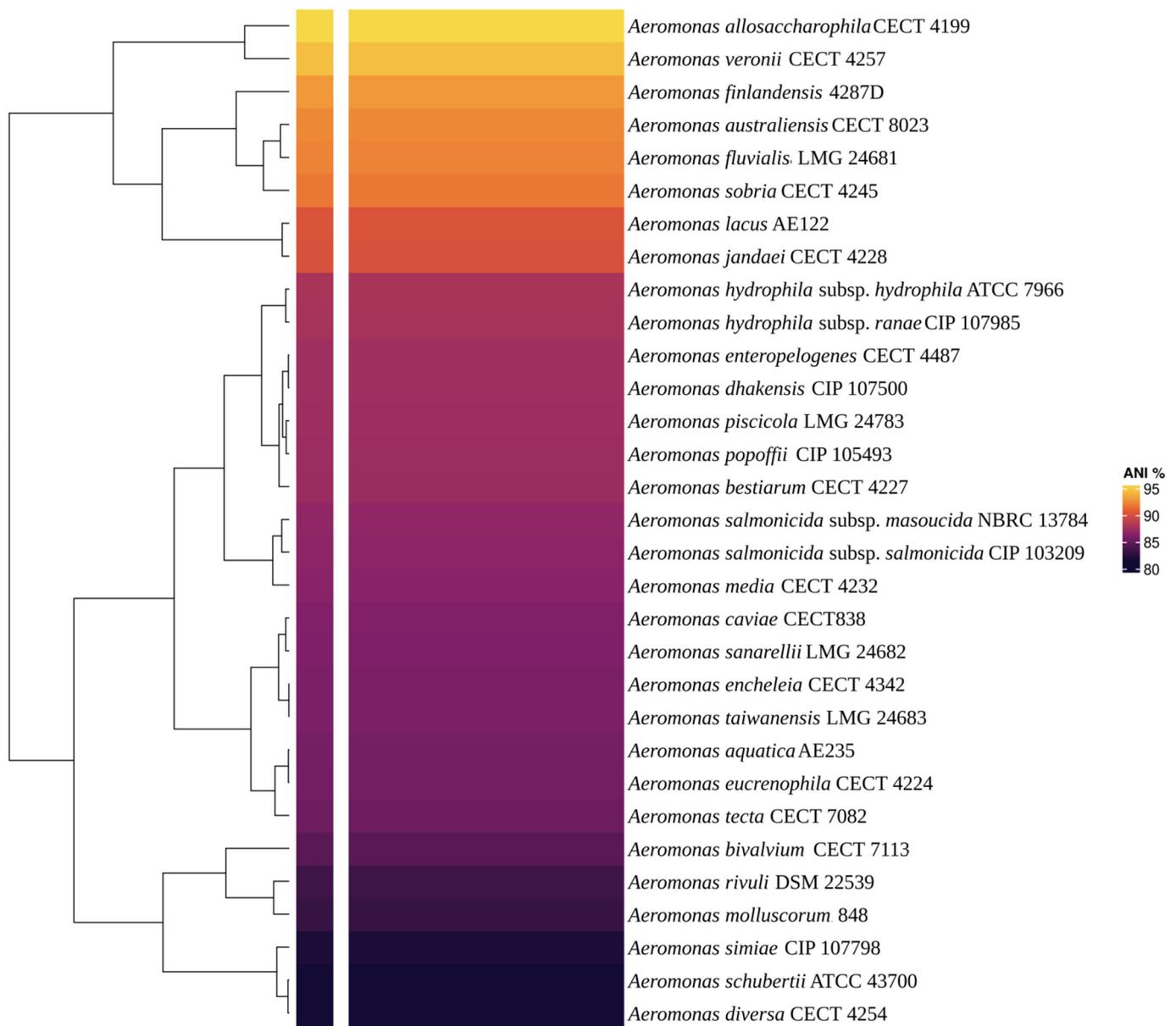


Figure 4. The heatmap showed the ANIb result. The main *Aeromonas* genus type strain was used to compare with the AE59-TE2 genome. The yellow color shows the most similar genome when compared with the AE59-TE2 genome. The value of yellow is 95.48% and represents *A. allosaccharophila* CECT 4199 genome.

3.5. Genome Mining of *Aeromonas allosaccharophila* AE59-TE2

Gene annotation with the PROKKA software resulted in 4075 coding sequences, 10 rRNA, and 105 tRNA. The RAST server annotated 4173 features, including 4050 protein-coding sequences and 123 non-coding RNAs including tRNAs and rRNAs, with 2177 (52.17%) of them being categorized in at least one RAST-defined functional category (Figure 5). Five sequences associated with “Phages, Prophages, Transposable elements, Plasmids” were identified that included two phage tail proteins, two proteins linked to phage replication, and one linked to DNA synthesis. Furthermore, 43 non-assembled sequences were also annotated with the RAST server and compared to the nr database. Among these, six high-identity (>90%) matches with the *Aeromonas* pS68-1 plasmid (CP022182.1) were observed. The AntiSMASH tool identified one homoserine lactone cluster (647,196–667,849 nt),

a 20 kb region comprising one core gene, three biosynthetic genes, and three regulatory genes.

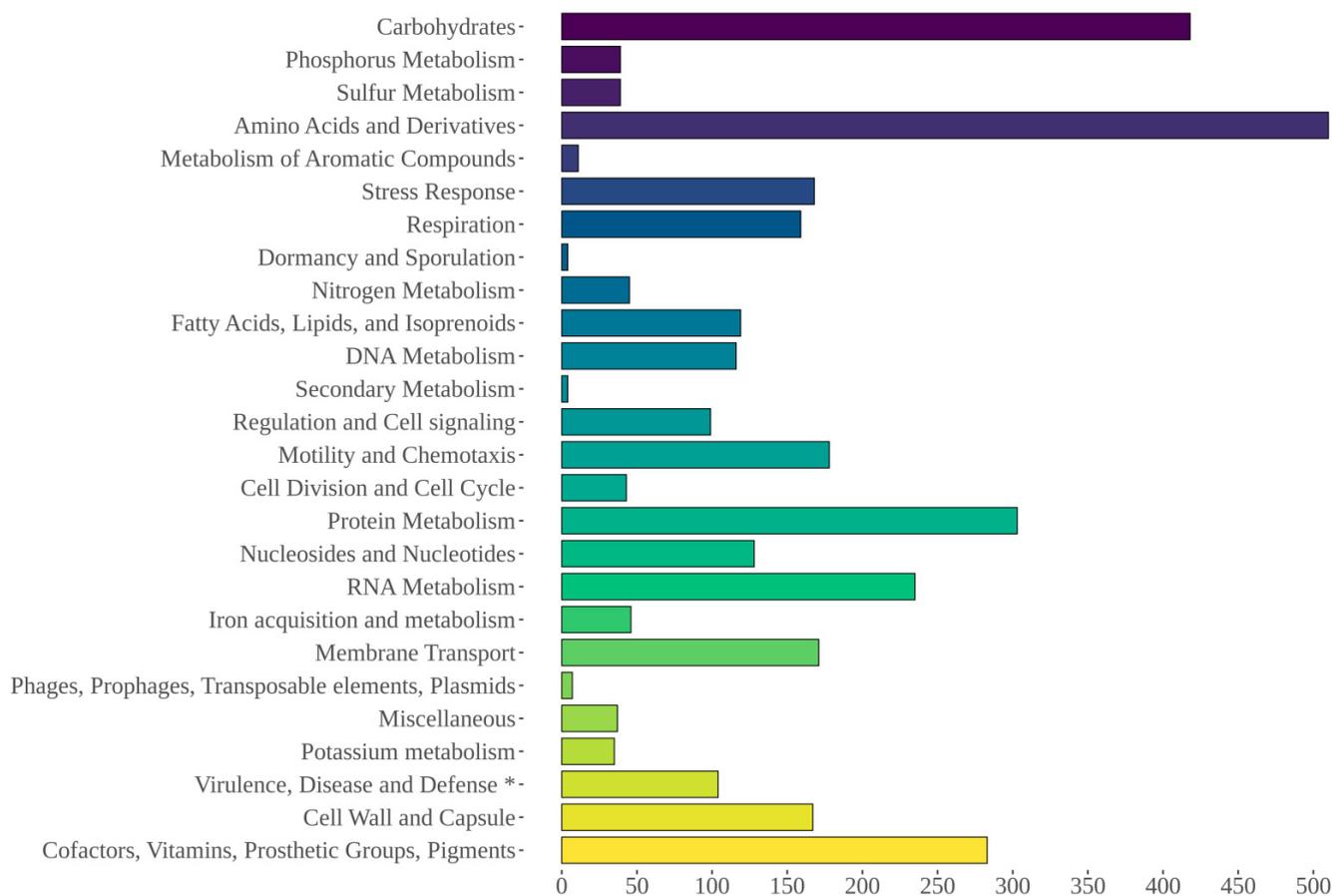


Figure 5. Functional RAST categories annotated for AE59 predicted sequences.

3.6. Identification and Comparative Analysis of AE59-TE2 Bacteriocin-Related Sequences

The RAST server revealed 101 matches for the virulence, disease, and defense category (Supplementary Table S5). Five of these sequences were annotated into the tolerance to colicin E2 subsystem and nine into the colicin V and bacteriocin production cluster subsystem (Table 2). One predicted sequence (peg.850, 162 aa) exhibited homology to the colicin V production protein (CvpA). Genomic enrichment with the GO FEAT tool revealed four sequences associated with antimicrobial substances: a bacteriocin production protein (CvpA); a Tol-Pal system protein TolQ; a cell envelope integrity protein TolA; and an outer membrane receptor for ferrienterochelin and colicins (Supplementary Table S6). The AE59-TE2 CvpA protein sequence was correlated with a bacteriocin production protein (CvpA) predicted from *A. veronii* (UniProtKB accession number: A0A0T6U8X2) with 98.78% (162/164) coverage and 100% identity. BLAST analysis showed 100% coverage and 100% identity with *Aeromonas* CvpA family protein (accession number: WP_005337086.1), confirming the presence of an important gene related to the production of bacteriocin in strain AE59-TE2. The BLAST analysis against CvpA colicin V production protein (UniProtKB/SwissProt accession number: P08550.1) from *Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655 showed 99% coverage and 64.59% identity.

Table 2. Bacteriocin-related genes of AE59-TE2 identified by RAST functional annotation tool.

Subsystem	Putative Function	Gene ID
Colicin V and Bacteriocin Production Cluster	DedA protein	peg.679 peg.2991 peg.1442
	Amidophosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.14) Colicin V production protein	peg.851 peg.850
	DedD protein	peg.934
	Folypolyglutamate synthase (EC 6.3.2.17); Dihydrofolate synthase (EC 6.3.2.12)	peg.933
	Acetyl-coenzyme A carboxyl transferase beta chain (EC 6.4.1.2) tRNA pseudouridine synthase A (EC 4.2.1.70)	peg.932 peg.931
Tolerance to colicin E2	Conserved uncharacterized protein CreA	peg.2597 peg.2682
	Two-component response regulator CreB	peg.2016
	Two-component response regulator CreC Inner membrane protein CreD	peg.2017 peg.2020

BLASTp analyses found four *zooA*-like sequences in the AE59-TE2 genome. The *zooA* gene encodes a Zoocin A protein, a peptidase, from the M23/M37 family from *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (UniProtKB/SwissProt accession number: O54308). One sequence with 50% identity, was annotated as MepM_2 (Murein DD-endopeptidase); another with 46.73% identity, annotated as MepM_1 (Murein DD-endopeptidase); two sequences with 45% and 34.21% identity, were annotated as hypothetical proteins (Table 3). Multiple alignments demonstrated that the most conserved region was between positions 375–500 aa, a region that contains the peptidase M23 domain (Figure 6).

Table 3. BLAST result between AE59-TE2 annotation and bacteriocins from UniProt Database.

Result of BLASTp AE59-TE2 (Amino Acid by Prokka Annotation) X Bacteriocins DB											
Sequence from AE59 (Query)	% Identity	Subject Acc.Ver	Alignment Length	Mismatches	Gap Opens	q-Start	q-End	s-Start	s-End	E-Value	Bit Score
GAJHKBHP_00589	46.73%	Zoocin A	92	42	2	319	403	22	113	2.08×10^{-19}	79.0
GAJHKBHP_03270	50.00%	(Uniprot Acc.	94	38	2	301	386	45	137	2.81×10^{-20}	82.4
GAJHKBHP_03313	34.21%	Number:	114	58	3	171	268	45	157	8.07×10^{-17}	70.5
GAJHKBHP_03813	45.0%	O54308)	100	47	3	192	284	39	137	6.67×10^{-17}	71.2

The DoBiscuit database was used to search for more sequences related to antimicrobial activity and found six sequences with more than 60% identity (Table 4).

The Functional annotation of orthologous groups with Kaas and KEGG Mapper Reconstruction tools annotated six categories of functional groups (Figure 7). The Metabolism category has 12 subcategories with 2700 genes, amongst these subcategories, the most important for this work are: Metabolism of terpenoids and polyketides with 25 genes and biosynthesis of other secondary metabolites with 44 genes. The biosynthesis of other secondary metabolites subcategories was presented in more detail in Table 5.

Using PROKKA and PATRIC, searches for keywords endopeptidase, endonuclease, polyketide, antibiotic, colicin and microcin unraveled 38 proteins (Table 6). PATRIC identified 129 metabolic pathways within the genome. The most important pathways related to antimicrobial activity were: Biosynthesis of secondary metabolites and Biosynthesis of polyketides and Nonribosomal peptides. In the Biosynthesis of the secondary metabolites category and puromycin Biosynthesis subcategory, a sequence was identified as an *xdhD* gene, a possible hypoxanthine oxidase.

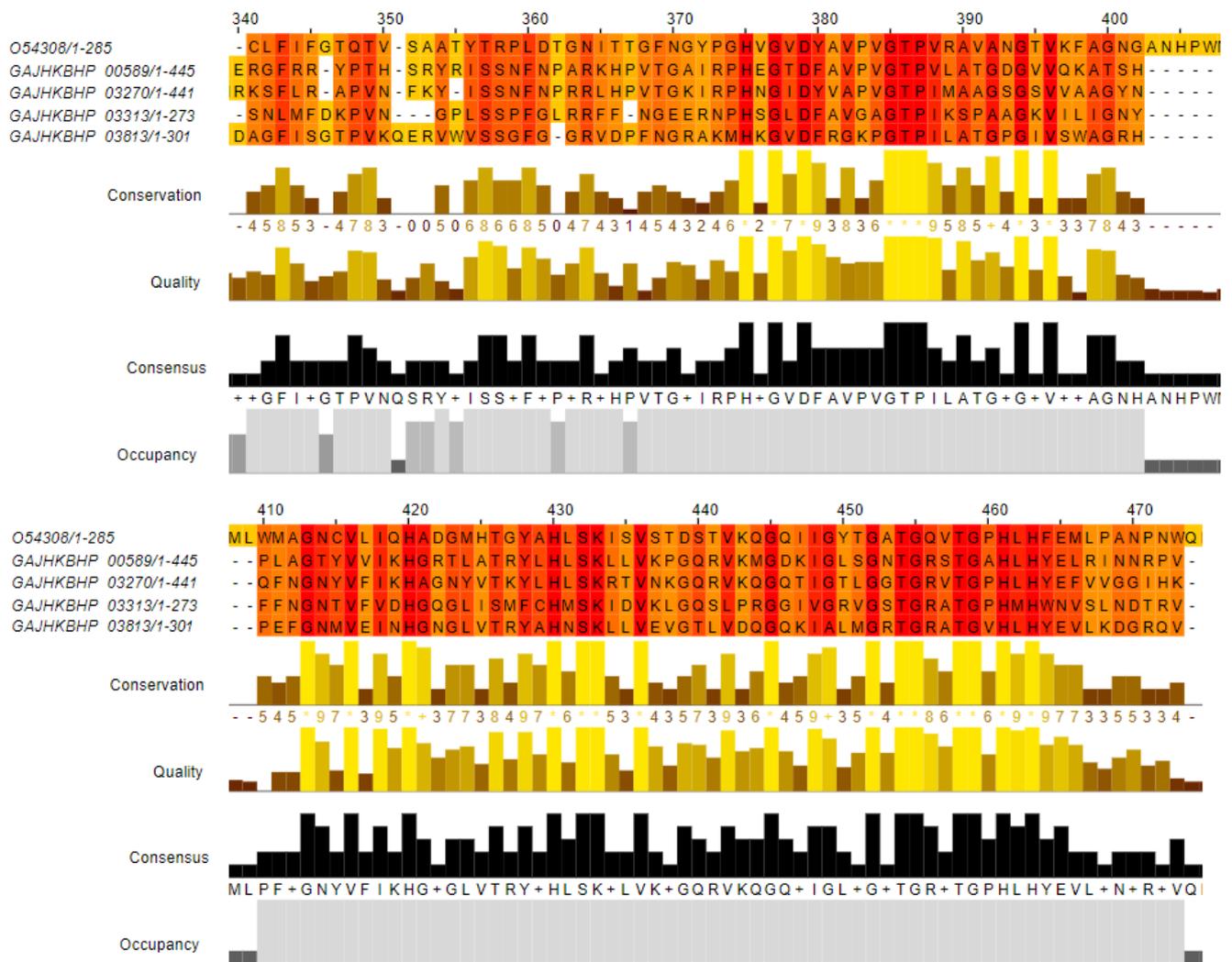


Figure 6. Multiple alignments between Zoocin A protein, a peptidase, from the M23/M37 family from *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus* (UniProtKB/SwissProt accession number: O54308 and four sequences from the AE59-TE2 genome resulted from BLAST. The positions 340–474 aa show the most conserved region. The Alignment was colored by conservation scheme; the regions with more conserved physicochemical properties are colored in orange (darker color) and the less conserved sites are colored in yellow (lighter color).

Table 4. BLAST result between AE59-TE2 annotation and sequences from the DoBiscuit Database.

Result of BLASTp AE59 (Prokka Annotation) X DoBiscuit Database						
Sequence from AE59 (Query)	% Identity	Subject	Classified	Relative	PROKKA Gene	PROKKA Product
GAJHKBHP_00274	73.33%	Rifam_00640	PKS TypeI modular	Ansamycin	<i>rpoC</i>	DNA-directed RNA polymerase subunit beta
GAJHKBHP_02296	63.01%	Rubra_00090	PKS TypeI modular	Rubradirin	<i>infA</i>	Translation initiation factor IF-1
GAJHKBHP_00363	62.65%	A4092_00490	NRPS/PKS TypeIII	Glycopeptide(teicoplanin-type)	<i>thiC</i>	Phosphomethylpyrimidine synthase

Table 4. Cont.

Result of BLASTp AE59 (Prokka Annotation) X DoBiscuit Database						
Sequence from AE59 (Query)	% Identity	Subject	Classified	Relative	PROKKA Gene	PROKKA Product
GAJHKBHP_01234	61.41%	Salino_00470	PKS TypeI modular	Salinomycin/Polyether	<i>fadH</i>	2% 2C4-dienoyl-CoA reductase
GAJHKBHP_02296	61.19%	Rubra_00040	PKS TypeI modular	Rubradirin/Ansamycin	<i>infA</i>	Translation initiation factor IF-1
GAJHKBHP_03276	60.16%	Polk_00010	PKS TypeI iterative PKS TypeII	Tetracyclic quinone glycoside Polyketomycin	<i>metK</i>	S-adenosylmethionine synthase

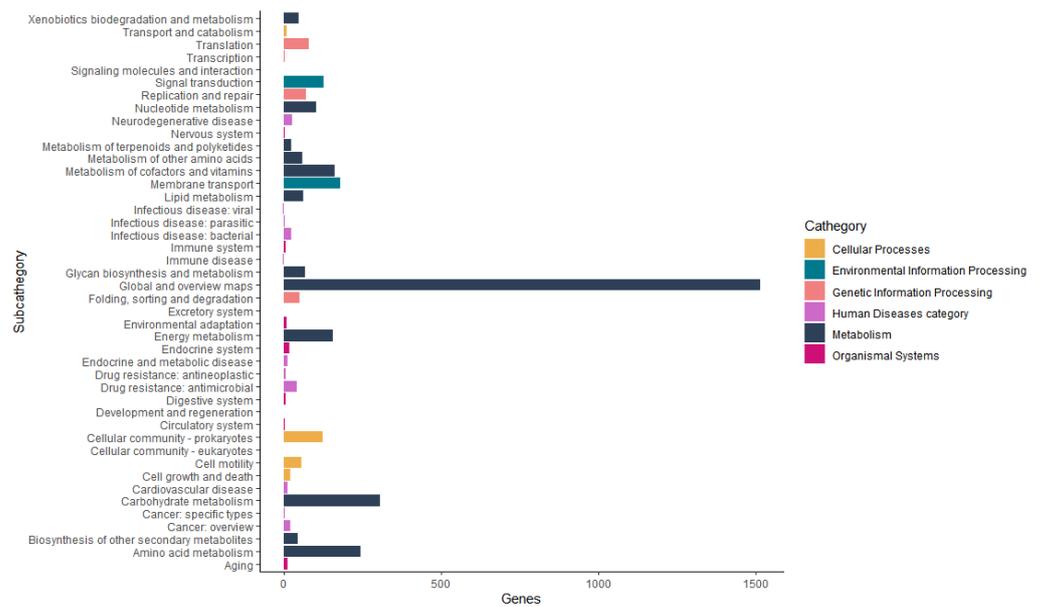


Figure 7. The Functional annotation of orthologous groups with Kaas and KEGG Mapper Reconstruction tools annotated 6 categories of functional groups.

Table 5. List of KEGG Biosynthesis of secondary metabolites Reference pathway.

Biosynthesis of Secondary Metabolites	Pathway Modules
Macrolide biosynthesis	M00773 Tylosin biosynthesis M00934 Mycinamicin biosynthesis M00774 Erythromycin biosynthesis M00775 Oleandomycin biosynthesis M00776 Pikromycin/methymycin biosynthesis M00777 Avermectin biosynthesis
Type II polyketide biosynthesis	M00778 Type II polyketide backbone biosynthesis M00779 Dihydrokalafungin biosynthesis M00780 Tetracycline/oxytetracycline biosynthesis M00823 Chlortetracycline biosynthesis M00781 Nogalavinone/aklavinone biosynthesis M00782 Mithramycin biosynthesis M00783 Tetracenomycin C/8-demethyltetracenomycin C biosynthesis M00784 Elloramycin biosynthesis
Biosynthesis of beta-lactams	M00672 Penicillin biosynthesis M00673 Cephameycin C biosynthesis M00675 Carbapenem-3-carboxylate biosynthesis M00736 Nocardicin A biosynthesis M00674 Clavaminic acid biosynthesis

Table 5. Cont.

Biosynthesis of Secondary Metabolites	Pathway Modules
	M00773 Tylosin biosynthesis
Macrolide biosynthesis	M00877 Kanosamine biosynthesis glucose 6-phosphate => kanosamine M00889 Puromycin biosynthesis
Biosynthesis of other antibiotics	M00815 Validamycin A biosynthesis M00904 Dapdiamides biosynthesis M00785 Cycloserine biosynthesis M00787 Bacilysin biosynthesis M00848 Aurachin biosynthesis M00788 Terpentecin biosynthesis M00819 Pentalenolactone biosynthesis M00903 Fosfomycin biosynthesis M00890 Roseoflavin biosynthesis

Table 6. Result keyword searches using PATRIC and PROKKA annotation. The keywords that were searched: “endopeptidase, endonuclease, polyketide (PKS), antibiotic, colicin, microcin, zoocin, bacteriocin and streptomycin”.

Results of Searches for Keywords: “Endopeptidase, Endonuclease, Polyketide, Antibiotic, Colicin and Microcin”			
Keyword	Annotation Tool	Sequence ID	Product
Endonuclease	PATRIC	peg.3314	Endonuclease I precursor/deoxyribonuclease I activity
	PATRIC	peg.2963	Endonuclease IV/deoxyribonuclease IV (phage-T4-induced) activity
	PATRIC	peg.2394	Predicted ATP-dependent endonuclease of the OLD family, YbjD subgroup
	PATRIC	peg.2112	DNA/RNA endonuclease G
	PATRIC	peg.1965	Endonuclease III/DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase activity
	PATRIC	peg.1792	Protein containing HNH endonuclease domain
	PATRIC	peg.1779	Esterase ybFF
	PATRIC	peg.1125	Flap endonuclease Xni
	PATRIC	peg.512	DNA mismatch repair endonuclease MutH
	PROKKA	GAJHKBHP_01017	putative DNA endonuclease SmrA
	PROKKA	GAJHKBHP_01117	Flap endonuclease Xni-YgdG
	PROKKA	GAJHKBHP_01958	Endonuclease III-Nth
	PROKKA	GAJHKBHP_02669	Endonuclease MutS2
	PROKKA	GAJHKBHP_02932	Endonuclease 4-Nfo
	Endopeptidase	PATRIC	peg.384
PATRIC		peg.577	Murein DD-endopeptidase MepM
PATRIC		peg.2124	Probable endopeptidase NlpC
PATRIC		peg.2264	Penicillin-insensitive murein endopeptidase
PATRIC		peg.3967	Murein-DD-endopeptidase (EC 3.4.99.-)
PROKKA		GAJHKBHP_00392	D-alanyl-D-alanine endopeptidase-PbpG_1
PROKKA		GAJHKBHP_00589	Murein DD-endopeptidase MepM
PROKKA		GAJHKBHP_02126	Oligoendopeptidase F% 2C plasmid-PepF1
PROKKA		GAJHKBHP_02243	Penicillin-insensitive murein endopeptidase-MepA_1
PROKKA		GAJHKBHP_03259	Neutral endopeptidase-PepO
PROKKA		GAJHKBHP_03270	Murein DD-endopeptidase MepM
PROKKA		GAJHKBHP_03927	D-alanyl-D-alanine endopeptidase-PbpG_2

Table 6. Cont.

Results of Searches for Keywords: “Endopeptidase, Endonuclease, Polyketide, Antibiotic, Colicin and Microcin”			
Keyword	Annotation Tool	Sequence ID	Product
Colicin	PATRIC	peg.1689	Colicin I receptor precursor
	PATRIC	peg.2329	Colicin V production protein
	PROKKA	GAJHKBHP_00287	Colicin I receptor-CirA_1
	PROKKA	GAJHKBHP_01798	Colicin I receptor-CirA_2
	PROKKA	GAJHKBHP_01806	Colicin I receptor-CirA_3
	PROKKA	GAJHKBHP_02310	Colicin V production protein-CvpA
Antibiotic	PATRIC	peg.705	Antibiotic biosynthesis monooxygenase
	PROKKA	GAJHKBHP_03466	Phenazine antibiotic resistance protein EhpR
Microcin	PATRIC	peg.2417	Microcin C7 immunity MccF-like protein
	PROKKA	GAJHKBHP_02397	Microcin C7 self-immunity protein MccF
Polyketide	PATRIC	peg.1909	Polyketide synthase modules and related proteins
	PATRIC	peg.2168	Polyketide synthase modules and related proteins

4. Discussion

Messi et al., 2003 [22], had previously reported on the potential of *Aeromonas* strains to produce antimicrobial substances. Following their rationale, a screening for antimicrobial activity was performed and confirmed that strains of the *Aeromonas* genus are widely antagonistic, as observed in Figure 1. Thirty-eight of the 57 strains tested demonstrated some type of antagonistic activity towards at least one highly pathogenic bacterial strain. Screening analysis detected a group of seven strains, which can inhibit both gram-positive and gram-negative bacteria, with a different profile from others described in the literature, this is unusual and important for bacteriocin research. A lack of bacteriocin patents suggests they have perhaps been neglected and are an opportunity for novel discoveries. A glance further back in the literature reveals that bacteriocin-producing strains have been described to inhibit *Yersinia ruckeri*, *Listonella anguillarum*, and *Photobacterium damsela* [64]; fish pathogens, such as *Vibrio tubiashii* [65]; and strains associated with food contamination, such as *Staphylococcus* sp. and *Lactobacillus* sp. [21,22].

Strain AE59-TE2 stands out for being able to inhibit 14 of the 16 indicator strains tested. This strain exhibited antagonistic activity towards *K. pneumoniae* KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase). KPC-producing bacteria are a group of microorganisms with elevated resistance to various antibiotics, which causes infections that commonly available antibiotics can no longer effectively treat [66]. This result is highlighted, since the majority of bacteriocins come from gram-positive bacteria and are not reported as being antagonistic towards gram-negative pathogenic microorganisms. There is a need for bacteriocins that target gram-negative food-spoilage strains, such as those from the genera *Salmonella* and *Escherichia* [25,26]. These findings shine a light on possible new solutions for medical, pharmaceutical, and food sectors.

In this work, the characterization of the *Aeromonas* AE59-TE2 strain was proposed. Species identification and taxonomy within the *Aeromonas* genus is controversial, even with the contribution of genomic analyses. Based on our data and as described in the literature, 16S rRNA gene sequences are highly conserved and do not contain enough genetic signal to separate *A. veronii* from *A. allosaccharophila* [12]. Separating these taxons requires more than 16S rRNA sequence and biochemical tests [67]. DDH analysis and MLSA [45] phylogenetic inference were used with multiple housekeeping genes, including *rpoD*, for taxonomic identification, and the strain was classified as *Aeromonas allosaccharophila* AE59-TE2.

Since *Aeromonas* strains are described as opportunistic pathogens, an equally important factor was assessing the strain’s virulence potential, which could impair its biotechnological applications in the future [11,12]. Aerolysin (*aerA*) [68], toxin A (*rtxA*) [69], layer A (*vapA*) and secretion systems types II (T2SS) (*exeAB* and *exeC-N* operons), T3SS (*ascV*, *aopP*, *aopH*, *ascC* and *aexT* genes), T4SS (*traB*, *traC*, *traD*, *traE*, *trb*), *traA*, *traF*, *traG*, *traH*, *traI*, *traJ* and *traK*

genes, with *traA*, *traF-tral* as core components) and T6SS (*hcp* (haemolysin), *vgrG2* (valine), *vgrG* (glycine), *vgrG1* (ADP-ribosyltransferase activity), *vasH* (transcription regulator) and the *vasK* (unknown function genes) altogether make up for the major virulence factors identified in the *Aeromonas* genus [70–73].

The virulence factors database (VFDB), from the ABRicate tool, identified the *ascV* and *ascC* genes, which are type III secretion system (T3SS) structural genes, and *aopH*, one of the main effector genes. Vanden Bergh and Frey (2014) [74] demonstrated that, due to several mutations and genetic rearrangements, changes may occur in the type III secretion system. Thus, to affirm its integrity, one must analyze whether the structural genes (*ascV* and *ascC*) are intact and whether the main effector genes (*aopH*, *aexT*, *ati2*, *aopO*, *aopP* and *aopS*) are present [74]. The T3SS is a complex structure used by gram-negative bacteria, which is capable of injecting effector proteins directly into the host cell cytoplasm. Only one effector gene was found in the AE59-TE2 genome. Furthermore, a progressive loss of virulence potential in *A. salmonicida* is observed as constant genetic deletions and additions occur due to horizontal gene transfer with environmental bacteria. This is especially observed in strains grown in laboratories that do not undergo the selective pressures of natural environments [74]. It is worth mentioning that some genes found in the AE59-TE2 genome may not be functional because they are truncated, as has already been described for *Aeromonas* virulence mechanisms [75]. Further analyses found the genes *blaOXA* (a beta-lactamase), *arsD* (an arsenite efflux transporter metallochaperone), *arsC* (glutaredoxin-dependent arsenate reductase), *rsmA* and *adeF* (antibiotic efflux pump), *OXA-726* (beta-lactamase/antibiotic inactivation), and *EF-Tu* (resistance to Pulvomycin). These genes are mostly related to antibiotic resistance. Concerns about virulence with this strain are founded but can be circumvented by using bacteriocins in a purified form. There is increasing interest in the pharmaceutical industry for the use of purified bacteriocins [76].

The antiSMASH tool identified a homoserine lactone cluster in the AE59-TE2 genome. The N-acyl homoserine-lactone (AHL) is a “signal” molecule in gram-negative bacteria and is responsible for the regulation of several biological processes, such as biofilm formation, antibiotic production, and motility [10]. Thus, this is a vital cluster that may be related to the antimicrobial activity observed in our analyses.

RAST server annotation uncovered a CvpA protein in the AE59-TE2 genome. This protein is required for colicin V production and was originally identified in plasmid pColV-K30 from *Escherichia coli*. Nonetheless, this is not the structural gene for the colicin V bacteriocin [77]. The *cvpA* gene is chromosomal and is required for colicin V production and secretion [77]. It encodes an inner membrane protein that is involved in the colicin V export machinery [77]. The colicin V structural *cvaC* gene and the *cvaA* and *cvaB* genes are required for toxin processing and export. The protein that confers immunity on the host cell is encoded by the *cvi* gene [78]. Gene clusters similar to known bacteriocins have been described in other *Aeromonas* genomes [79], and the receptor for ferrienterochelin and colicins was identified in *A. salmonicida* subsp. *pectinolytica* 34melT genome [80]. However, no correlation between the presence of these clusters and bacteriocin activity has been reported until now. BLAST analysis between a CvpA protein identified in the AE59-TE2 genome and a CvpA colicin V production protein from *Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655 revealed a 64.59% identity. This result suggests that the gene could be associated with the production and secretion of colicin V peptide, *cvaC* gene, or a similar structural peptide gene [78]. However, no significant homology to the *E. coli* *cvaC* gene was found.

Blast analyses identified four sequences with similarities to the *zooA* gene. This gene encodes a Zn-metalloprotease called zoocin A, belonging to the M23/M37 family, and isolated initially from *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. This protein functions as an enzymatic that is active against gram-positive bacteria, cleaving peptides from their cell wall [81]. The AE59-TE2 strain was able to inhibit the growth of gram-positive bacteria, namely *Enterococcus* sp. and *Staphylococcus* sp., which is not a common feature for gram-negative bacteriocin-producing strains. These data suggest that the AE59-TE2 strain might use different mechanisms to inhibit gram-negative and gram-positive bacteria.

Multiple alignments between the four sequences found in the AE59-TE2 genome and other zooA sequences from the UniProt database demonstrated a highly conserved region for a peptidase M23 domain, suggesting that they may be new sequences related to the production of bacteriocins similar to Zoocin A.

The BLAST against DoBiscuit Database resulted in six sequences with more than 60% identity with sequences related to antibiotics. These sequences were annotated in the PROKKA software as RpoC, InfA (translation initiation factor IF-1), ThiC (phosphomethylpyrimidine synthase), FadH (2,4-dienoyl-CoA reductase), and MetK (S-adenosylmethionine synthase). Proteins RpoC and InfA could be related with resistance to Ansamycin and Rubradirin, respectively. The ThiC protein is associated with thiamine biosynthesis. The FadH protein is a NADPH-dependent 2,4-dienoyl-CoA reductase, and MetK protein catalyzes the formation of S-adenosylmethionine (AdoMet) from methionine and ATP and is associated with tylosin production [82]. Tylosin is a macrolide antibiotic that is used as a feed additive in veterinary medicine.

KEGG analysis provided a general characterization of the genome and highlighted several important pathways to be studied. These results were further explored by investigating and comparing sequences with genes of known important antimicrobial compounds. For instance, the peptidase family C39 contains bacteriocin processing endopeptidases. In this genome, the *mepM* gene was identified and is related to peptidoglycan synthesis [14]. Also identified was the *nlpC* gene, which is related to cell wall remodeling, cell separation during division, and cleaving non-canonical peptide bonds [83]. Zoocin A is a D-alanyl-L-alanyl endopeptidase, which hydrolyses cross bridges in the peptidoglycan structure of susceptible *streptococci* [84]. The PROKKA software identified two sequences as D-alanyl-D-alanine endopeptidases (GAJHKBHP_00392 and GAJHKBHP_03927), corroborating with previous results of Zoocin A sequences. One protein containing an HNH endonuclease domain (Peg.1792) was annotated by the PATRIC server. HNH-type endonucleases are known as Nuclease Bacteriocins (NB) [85]. Polyketides (PKS) were also pursued due to their antimicrobial activity, as described in the literature. Kegg analysis identified the *rfb* operon, which comprises four genes (*rfbABCD*) and is involved in dTDP-rhamnose biosynthesis. Genes *rfbAB* transform D-glucose-1-phosphate into dTDP-4-oxo-6-deoxy-D-glucose, an essential substance in polyketide sugar unit biosynthesis. This substance is further processed by genes *rfbCD*, resulting in dTDP-L-rhamnose. This latter substance can be involved in the biosynthesis of enediyne antibiotics and streptomycin. Streptomycin, for instance, is an aminoglycoside that possesses antimicrobial activity towards many bacteria, such as *Bacillus subtilis*, *E. coli*, certain strains of *Salmonella*, *B. mycoides*, *B. cereus*, and *P. aeruginosa* [86]. Several enzyme complexes can be produced by the secondary metabolism of bacteria. Type I PKSs, known as modular/iterative, are multicatalytic enzymes, which give rise to known natural products, such as macrolides (erythromycin) and polyenes (nystatin). On the other hand, type II aromatic PKSs are mono and bifunctional enzymes that interact during the synthesis of polycyclic aromatic compounds, such as tetracycline or doxorubicin [87]. Polyketide synthase modules and other related proteins were annotated in the PATRIC server (peg.1909). Antibiotic biosynthesis monooxygenase (ABM) is a protein superfamily that is involved in the production of several antibiotics, playing an important role in the biosynthesis of aromatic polyketides. ABM leads to a significant increase in antibiotic production [88]. The PATRIC server identified an antibiotic biosynthesis monooxygenase (peg.705), demonstrating another important sequence related to antimicrobial activity and how rich is the genome. The PATRIC server also demonstrated several important pathways related to antimicrobial activity to be further explored in the future.

These genomic analyses of an *A. allosaccharophila* strain fill in a knowledge gap for this species, which has not been studied in such detail before. Furthermore, the *A. allosaccharophila* AE59-TE2 genome has similarities with the enzymatic zoocin A endopeptidase sequences from streptococci bacteria. AE59-TE2 possesses a broad spectrum of inhibitory activity, targeting gram-positive and gram-negative multidrug resistant pathogens. Genomic analyses revealed important sequences associated with antimicrobial activity. Further anal-

yses are required to better elucidate this antimicrobial substance, since it holds promising biotechnological use for the health and food sectors.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/life12101492/s1>, Figure S1: Antibacterial activity of strain AE59-TE2 against *Escherichia coli*. Nutrient agar plate containing two producers of antimicrobial substances (AE59-TE2 and AE38.XC4), showing an inhibition halo against the *E. coli* indicator bacteria. The method used was the agar diffusion assay (Tagg and McGiven, 1971); Figure S2: Flowchart depicting the assembly steps; Table S1: *Aeromonas* type strain obtained from EZBio Cloud and used for MLSA phylogenetic tree construction, in silico DDH and ANI. Table.; Table S2: Statistics for raw and filtered reads, Table.; Table S3: Results of in silico DDH analysis carried out with GGDC tool; Table S4: Result of search for virulence genes with virulence factors database (VFDB) from ABRicate tool; Table S5: AE59-TE2 genes annotated in the “Virulence, Disease and Defense” RAST category; Table S6: Result of putative bacteriocins sequences identified by BOA tool and compared with RAST, GoFeat tool and BACTIBASE tool result.

Author Contributions: Conceptualization, S.d.S., A.M. and S.S.d.O.; methodology, S.d.S. and S.S.d.O.; Data curation and Formal analysis, S.d.S., F.A.d.F.G., J.R.V.A., Y.P.A.d.S. and R.T.J.R.; Investigation, and project administration, S.d.S., A.M. and S.S.d.O.; Resources and funding acquisition, S.S.d.O., A.M., Â.C.d.F.-A. and F.L.T.; Supervision, A.M. and S.S.d.O.; writing—original draft preparation, S.d.S. and F.A.d.F.G.; writing—review and editing, S.d.S., F.A.d.F.G., J.R.V.A., S.S.d.O., A.M., A.S.W. and J.R.d.A.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by Coordination for the Qualification of Higher Level Staff (CAPES) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) under the funding number: 141225/2018-1.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The Whole Genome Shotgun (WGS) project of *Aeromonas allosaccharohila* strain AE59-TE2 has been deposited at GenBank under the accession CP090911. The AE59-TE2 BioSample accession number is SAMN08436981 and the Bioproject accession number is PRJNA432149.

Acknowledgments: We acknowledge Marco A. L. Miguel (Laboratory of Food Microbiology, UFRJ), Beatriz Meurer Moreira (Laboratory of Investigation in Medical Microbiology, UFRJ), and Kátia Regina Netto dos Santos (Laboratory of Hospital Infection, UFRJ) for providing the strains used as indicators. We also would like to thank the “Postgraduate Research Program in Plant Biotechnology and Bioprocesses PBV/UFRJ”. F.A.d.F.G. and J.R.d.A.R. also would like to thank CAPES and CNPq for their support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Hemeg, H.A. Nanomaterials for alternative antibacterial therapy. *Int. J. Nanomed.* **2017**, *12*, 8211–8225. [[CrossRef](#)]
2. Ayukekbong, J.A.; Ntemgwa, M.; Atabe, A.N. The threat of antimicrobial resistance in developing countries: Causes and control strategies. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **2017**, *6*, 47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Donkor, E.S. Nosocomial Pathogens: An In-Depth Analysis of the Vectorial Potential of Cockroaches. *Trop. Med. Infect. Dis.* **2019**, *4*, 14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Tamma, P.D.; Aitken, S.L.; Bonomo, R.A.; Mathers, A.J.; van Duin, D.; Clancy, C.J. Infectious Diseases Society of America Guidance on the Treatment of Extended-Spectrum β -lactamase Producing Enterobacterales (ESBL-E), Carbapenem-Resistant Enterobacterales (CRE), and *Pseudomonas aeruginosa* with Difficult-to-Treat Resistance (DTR-*P. aeruginosa*). *Clin. Infect. Dis.* **2020**, *72*, e169–e183. [[CrossRef](#)]
5. Sánchez-López, E.; Gomes, D.; Esteruelas, G.; Bonilla, L.; Lopez-Machado, A.L.; Galindo, R.; Cano, A.; Espina, M.; Ettcheto, M.; Camins, A.; et al. Metal-Based Nanoparticles as Antimicrobial Agents: An Overview. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 292. [[CrossRef](#)]
6. Fira, D.; Dimkić, I.; Berić, T.; Lozo, J.; Stanković, S. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *J. Biotechnol.* **2018**, *285*, 44–55. [[CrossRef](#)]
7. Radaic, A.; de Jesus, M.B.; Kapila, Y.L. Bacterial anti-microbial peptides and nano-sized drug delivery systems: The state of the art toward improved bacteriocins. *J. Control. Release* **2020**, *321*, 100–118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

8. Fernandez, M.; Godino, A.; Príncipe, A.; Ramírez, V.L.; Quesada, J.M.; Rigo, V.; Espinosa-Urgel, M.; Morales, G.M.; Fischer, S. Characterization of the bacteriocins and the PrtR regulator in a plant-associated *Pseudomonas* strain. *J. Biotechnol.* **2020**, *307*, 182–192. [[CrossRef](#)]
9. Zhu, J.-W.; Zhang, S.-J.; Wang, W.-G.; Jiang, H. Strategies for Discovering New Antibiotics from Bacteria in the Post-Genomic Era. *Curr. Microbiol.* **2020**, *77*, 3213–3223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Fernández-Bravo, A.; Figueras, M.J. An Update on the Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Epidemiology, and Pathogenicity. *Microorganisms* **2020**, *8*, 129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Abbott, S.L.; Cheung, W.K.W.; Janda, J.M. The Genus *Aeromonas*: Biochemical Characteristics, Atypical Reactions, and Phenotypic Identification Schemes. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 2348–2357. [[CrossRef](#)]
12. Janda, J.M.; Abbott, S.L. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **2010**, *23*, 35–73. [[CrossRef](#)]
13. Valderrama, K.; Soto-Dávila, M.; Segovia, C.; Vásquez, I.; Dang, M.; Santander, J. *Aeromonas salmonicida* infects Atlantic salmon (*Salmo salar*) erythrocytes. *J. Fish Dis.* **2019**, *42*, 1601–1608. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Park, S.Y.; Han, J.E.; Kwon, H.; Park, S.C.; Kim, J.H. Recent Insights into *Aeromonas salmonicida* and Its Bacteriophages in Aquaculture: A Comprehensive Review. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *30*, 1443–1457. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Tomás, J.M. The Main *Aeromonas* Pathogenic Factors. *ISRN Microbiol.* **2012**, *2012*, 256261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Jin, L.; Chen, Y.; Yang, W.; Qiao, Z.; Zhang, X. Complete genome sequence of fish-pathogenic *Aeromonas hydrophila* HX-3 and a comparative analysis: Insights into virulence factors and quorum sensing. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 15479. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Greiner, M.; Anagnostopoulos, A.; Pohl, D.; Zbinden, R.; Zbinden, A. A rare case of severe gastroenteritis caused by *Aeromonas hydrophila* after colectomy in a patient with anti-Hu syndrome: A case report. *BMC Infect. Dis.* **2021**, *21*, 1097. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Von Graevenitz, A. The Role of *Aeromonas* in Diarrhea: A Review. *Infection* **2007**, *35*, 59–64. [[CrossRef](#)]
19. Dias, C.; Ribeiro, M.; Correia-Branco, A.; Domínguez-Perles, R.; Martel, F.; Saavedra, M.J.; Simões, M. Virulence, attachment and invasion of Caco-2 cells by multidrug-resistant bacteria isolated from wild animals. *Microb. Pathog.* **2019**, *128*, 230–235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Dias, C.; Borges, A.; Saavedra, M.J.; Simões, M. Biofilm formation and multidrug-resistant *Aeromonas* spp. from wild animals. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2018**, *12*, 227–234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Moro, E.; Weiss, R.D.N.; Friedrich, R.S.; Nunes, M.P. Bacteriocin-like Substance of *Aeromonas hydrophila*. *Mem. Do Inst. Oswaldo Cruz* **1997**, *92*, 115–116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Messi, P.; Guerrieri, E.; Bondi, M. Bacteriocin-like substance (BLS) production in *Aeromonas hydrophila* water isolates. *FEMS Microbiol. Lett.* **2003**, *220*, 121–125. [[CrossRef](#)]
23. Simons, A.; Alhanout, K.; Duval, R.E. Bacteriocins, Antimicrobial Peptides from Bacterial Origin: Overview of Their Biology and Their Impact against Multidrug-Resistant Bacteria. *Microorganisms* **2020**, *8*, 639. [[CrossRef](#)]
24. Kaur, S.; Kaur, S. Bacteriocins as Potential Anticancer Agents. *Front. Pharmacol.* **2015**, *6*, 272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Crowe, S.J.; Bottichio, L.; Shade, L.N.; Whitney, B.M.; Corral, N.; Melius, B.; Arends, K.D.; Donovan, D.; Stone, J.; Allen, K.; et al. Shiga Toxin-Producing *E. coli* Infections Associated with Flour. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 2036–2043. [[CrossRef](#)]
26. Hergens, M.-P.; Öhd, J.N.; Alm, E.; Askling, H.H.; Helgesson, S.; Insulander, M.; Lagerqvist, N.; Svenungsson, B.; Tihane, M.; Tolfvenstam, T.; et al. Investigation of a food-borne outbreak of gastroenteritis in a school canteen revealed a variant of sapovirus genogroup V not detected by standard PCR, Sollentuna, Sweden, 2016. *Eurosurveillance* **2017**, *22*, 30543. [[CrossRef](#)]
27. Pisoschi, A.M.; Pop, A.; Georgescu, C.; Turcuş, V.; Olah, N.K.; Mathe, E. An overview of natural antimicrobials role in food. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *143*, 922–935. [[CrossRef](#)]
28. Schulz, S.; Stephan, A.; Hahn, S.; Bortesi, L.; Jarczowski, F.; Bettmann, U.; Paschke, A.-K.; Tusé, D.; Stahl, C.H.; Giritch, A.; et al. Broad and efficient control of major foodborne pathogenic strains of *Escherichia coli* by mixtures of plant-produced colicins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, E5454–E5460. [[CrossRef](#)]
29. Śmiałek, J.; Nowakowski, M.; Bzowska, M.; Bocheńska, O.; Wlizo, A.; Kozik, A.; Dubin, G.; Mak, P. Structure, Biosynthesis, and Biological Activity of Succinylated Forms of Bacteriocin BacSp222. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6256. [[CrossRef](#)]
30. Palú, A.P.; Gomes, L.M.; Miguel, M.A.L.; Balassiano, I.T.; Queiroz, M.L.P.; Freitas-Almeida, A.C.; de Oliveira, S.S. Antimicrobial resistance in food and clinical *Aeromonas* isolates. *Food Microbiol.* **2006**, *23*, 504–509. [[CrossRef](#)]
31. Martin-Carnahan, A.; Joseph, S.W. *Aeromonadaceae*. In *The Proteobacteria, Part B, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed.; Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T., Garrity, G.M., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2005; Volume 2, pp. 556–580.
32. Tagg, J.R.; McGiven, A.R. Assay System for Bacteriocins. *Appl. Microbiol.* **1971**, *21*, 943. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Giambiagi-Marval, M.; Mafra, M.A.; Penido, E.G.C.; Bastos, M.C.F. Distinct groups of plasmids correlated with bacteriocin production in *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* **1990**, *136*, 1591–1599. [[CrossRef](#)]
34. Reich, M.; Liefeld, T.; Gould, J.; Lerner, J.; Tamayo, P.; Mesirov, J.P. GenePattern 2.0. *Nat. Genet.* **2006**, *38*, 500–501. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A.; Struhl, K. (Eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 1997.
36. Bolger, A.M.; Lohse, M.; Usadel, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2114–2120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

37. Bankevich, A.; Nurk, S.; Antipov, D.; Gurevich, A.A.; Dvorkin, M.; Kulikov, A.S.; Lesin, V.M.; Nikolenko, S.I.; Pham, S.; Prjibelski, A.D.; et al. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* **2012**, *19*, 455–477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Bosi, E.; Donati, B.; Galardini, M.; Brunetti, S.; Sagot, M.-F.; Lio, P.; Crescenzi, P.; Fani, R.; Fondi, M. MeDuSa: A multidraft based scaffold. *Bioinformatics* **2015**, *31*, 2443–2451. [[CrossRef](#)]
39. Li, H.; Durbin, R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 589–595. [[CrossRef](#)]
40. Okonechnikov, K.; Conesa, A.; García-Alcalde, F. Qualimap 2: Advanced multi-sample quality control for high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **2016**, *32*, 292–294. [[CrossRef](#)]
41. Parks, D.H.; Imelfort, M.; Skennerton, C.T.; Hugenholtz, P.; Tyson, G.W. CheckM: Assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res.* **2015**, *25*, 1043–1055. [[CrossRef](#)]
42. Gurevich, A.; Saveliev, V.; Vyahhi, N.; Tesler, G. QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* **2013**, *29*, 1072–1075. [[CrossRef](#)]
43. Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410. [[CrossRef](#)]
44. Auch, A.F.; Von Jan, M.; Klenk, H.-P.; Göker, M. Digital DNA–DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. *Stand. Genom. Sci.* **2010**, *2*, 117–134. [[CrossRef](#)]
45. Colston, S.M.; Fullmer, M.S.; Beka, L.; Lamy, B.; Gogarten, J.P.; Graf, J. Bioinformatic Genome Comparisons for Taxonomic and Phylogenetic Assignments Using *Aeromonas* as a Test Case. *mBio* **2014**, *5*, e02136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Seemann, T. Prokka: Rapid Prokaryotic Genome Annotation. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2068–2069. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Hall, A.T. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. In *Nucleic Acids Symposium Series*; Information Retrieval Ltd.: London, UK, 1999; Volume 41, pp. 95–98.
48. Tamura, K.; Stecher, G.; Kumar, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* **2021**, *38*, 3022–3027. [[CrossRef](#)]
49. Richter, M.; Rosselló-Móra, R.; Oliver Glöckner, F.O.; Peplies, J. JSpeciesWS: A web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics* **2016**, *32*, 929–931. [[CrossRef](#)]
50. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R, Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2022; Available online: <https://www.R-project.org/> (accessed on 18 September 2022).
51. Vidal Amaral, J.R.; Jucá Ramos, R.T.; Almeida Araújo, F.; Bentes Kato, R.; Figueira Aburjaile, F.; de Castro Soares, S.; Góes-Neto, A.; Matiuzzi da Costa, M.; Azevedo, V.; Brenig, B.; et al. Bacteriocin Producing *Streptococcus agalactiae* Strains Isolated from Bovine Mastitis in Brazil. *Microorganisms* **2022**, *10*, 588. [[CrossRef](#)]
52. Liu, B.; Zheng, D.; Jin, Q.; Chen, L.; Yang, J. VFDB 2019: A comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *47*, D687–D692. [[CrossRef](#)]
53. Feldgarden, M.; Brover, V.; Gonzalez-Escalona, N.; Frye, J.G.; Haendiges, J.; Haft, D.H.; Hoffmann, M.; Pettengill, J.B.; Prasad, A.B.; Tillman, G.E.; et al. AMRFinderPlus and the Reference Gene Catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress response, and virulence. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 12728. [[CrossRef](#)]
54. Bortolaia, V.; Kaas, R.S.; Ruppe, E.; Roberts, M.C.; Schwarz, S.; Cattoir, V.; Philippon, A.; Allesoe, R.L.; Rebelo, A.R.; Florensa, A.F.; et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J. Antimicrob. Chemother.* **2020**, *75*, 3491–3500. [[CrossRef](#)]
55. Alcock, B.P.; Raphenya, A.R.; Lau, T.T.Y.; Tsang, K.K.; Bouchard, M.; Edalatmand, A.; Huynh, W.; Nguyen, A.-L.V.; Cheng, A.A.; Liu, S.; et al. CARD 2020: Antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, D517–D525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Overbeek, R.; Olson, R.; Pusch, G.D.; Olsen, G.J.; Davis, J.J.; Disz, T.; Edwards, R.A.; Gerdes, S.; Parrello, B.; Shukla, M.; et al. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, D206–D214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Ichikawa, N.; Sasagawa, M.; Yamamoto, M.; Komaki, H.; Yoshida, Y.; Yamazaki, S.; Fujita, N. DoBISCUIT: A database of secondary metabolite biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *41*, D408–D414. [[CrossRef](#)]
58. Sievers, F.; Wilm, A.; Dineen, D.; Gibson, T.J.; Karplus, K.; Li, W.; Lopez, R.; McWilliam, H.; Remmert, M.; Söding, J.; et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* **2011**, *7*, 539. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Blin, K.; Shaw, S.; Kloosterman, A.M.; Charlop-Powers, Z.; van Wezel, G.P.; Medema, M.H.; Weber, T. antiSMASH 6.0: Improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, W29–W35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Araujo, F.; Barh, D.; Silva, A.; Guimarães, L.C.; Ramos, R.T.J. GO FEAT: A rapid web-based functional annotation tool for genomic and transcriptomic data. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1794. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Moriya, Y.; Itoh, M.; Okuda, S.; Yoshizawa, A.C.; Kanehisa, M. KAAS: An automatic genome annotation and pathway reconstruction server. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35* (Suppl. S2), W182–W185. [[CrossRef](#)]
62. Davis, J.J.; Wattam, A.R.; Aziz, R.K.; Brettin, T.; Butler, R.; Butler, R.M.; Chlenski, P.; Conrad, N.; Dickerman, A.; Dietrich, E.M.; et al. The PATRIC Bioinformatics Resource Center: Expanding data and analysis capabilities. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, D606–D612. [[CrossRef](#)]

63. Grant, J.R.; Stothard, P. The CGView Server: A comparative genomics tool for circular genomes. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, W181–W184. [[CrossRef](#)]
64. Gibson, L.; Woodworth, J.; George, A. Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*. *Aquaculture* **1998**, *169*, 111–120. [[CrossRef](#)]
65. Lategan, M.J.; Gibson, L.F. Antagonistic activity of *Aeromonas media* strain A199 against *Saprolegnia* sp., an opportunistic pathogen of the eel, *Anguilla australis* Richardson. *J. Fish Dis.* **2003**, *26*, 147–153. [[CrossRef](#)]
66. Bassetti, M.; Giacobbe, D.R.; Giamarellou, H.; Viscoli, C.; Daikos, G.; Dimopoulos, G.; DE Rosa, F.G.; Giamarellou-Bourboulis, E.; Rossolini, G.; Righi, E.; et al. Management of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections. *Clin. Microbiol. Infect.* **2018**, *24*, 133–144. [[CrossRef](#)]
67. Nagar, V.; Shashidhar, R.; Bandekar, J.R. Characterization of *Aeromonas* strains isolated from Indian foods using *rpoD* gene sequencing and whole cell protein analysis. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *29*, 745–752. [[CrossRef](#)]
68. Howard, S.P.; Garland, W.J.; Green, M.J.; Buckley, J.T. Nucleotide sequence of the gene for the hole-forming toxin aerolysin of *Aeromonas hydrophila*. *J. Bacteriol.* **1987**, *169*, 2869–2871. [[CrossRef](#)]
69. Suarez, G.; Khajanchi, B.K.; Sierra, J.C.; Erova, T.E.; Sha, J.; Chopra, A.K. Actin cross-linking domain of *Aeromonas hydrophila* repeat in toxin A (RtxA) induces host cell rounding and apoptosis. *Gene* **2012**, *506*, 369–376. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Ast, V.M.; Schoenhofen, I.C.; Langen, G.R.; Stratilo, C.W.; Chamberlain, M.D.; Howard, S.P. Expression of the ExeAB complex of *Aeromonas hydrophila* is required for the localization and assembly of the ExeD secretion port multimer. *Mol. Microbiol.* **2002**, *44*, 217–231. [[CrossRef](#)]
71. Rangrez, A.Y.; Dayananda, K.M.; Atanur, S.; Joshi, R.; Patole, M.S.; Shouche, Y.S. Detection of Conjugation Related Type Four Secretion Machinery in *Aeromonas culicicola*. *PLoS ONE* **2006**, *1*, e115. [[CrossRef](#)]
72. Suarez, G.; Sierra, J.C.; Kirtley, M.L.; Chopra, A.K. Role of Hcp, a type 6 secretion system effector, of *Aeromonas hydrophila* in modulating activation of host immune cells. *Microbiology* **2010**, *156*, 3678–3688. [[CrossRef](#)]
73. Beaz-Hidalgo, R.; Figueras, M.J. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. *J. Fish Dis.* **2013**, *36*, 371–388. [[CrossRef](#)]
74. Bergh, P.V.; Frey, J. *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in the light of its type-three secretion system. *Microb. Biotechnol.* **2013**, *7*, 381–400. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Dallaire-Dufresne, S.; Tanaka, K.H.; Trudel, M.V.; Lafaille, A.; Charette, S.J. Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis. *Vet. Microbiol.* **2014**, *169*, 1–7. [[CrossRef](#)]
76. Jamaluddin, N.; Stuckey, D.C.; Ariff, A.B.; Wong, F.W.F. Novel approaches to purifying bacteriocin: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2017**, *58*, 2453–2465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Fath, M.J.; Mahanty, H.K.; Kolter, R. Characterization of a *purF* operon mutation which affects colicin V production. *J. Bacteriol.* **1989**, *171*, 3158–3161. [[CrossRef](#)]
78. Gilson, L.; Mahanty, H.K.; Kolter, R. Four plasmid genes are required for colicin V synthesis, export, and immunity. *J. Bacteriol.* **1987**, *169*, 2466–2470. [[CrossRef](#)]
79. Lenneman, E.M.; Barney, B.M.; Kuleshov, K.V.; Vodop'ianov, S.O.; Dedkov, V.G.; Markelov, M.L.; Kermanov, A.V.; Kruglikov, V.D.; Vodop'ianov, A.S.; Pisanov, R.V.; et al. Draft Genome Sequences of the Alga-Degrading Bacteria *Aeromonas hydrophila* Strain AD9 and *Pseudomonas pseudoalcaligenes* Strain AD6. *Genome Announc.* **2014**, *2*, e00624–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Pavan, M.E.; Pavan, E.E.; López, N.I.; Levin, L.; Pettinari, M.J. Living in an Extremely Polluted Environment: Clues from the Genome of Melanin-Producing *Aeromonas salmonicida* subsp. *pectinolytica* 34melT. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 5235–5248. [[CrossRef](#)]
81. Chen, Y.; Simmonds, R.S.; Young, J.K.; Timkovich, R. Solution structure of the recombinant target recognition domain of zoocin A. *Proteins: Struct. Funct. Bioinform.* **2013**, *81*, 722–727. [[CrossRef](#)]
82. Butler, A.R.; Gandecha, A.R.; Cundliffe, E. Influence of ancillary genes, encoding aspects of methionine metabolism, on tylosin biosynthesis in *Streptomyces fradiae*. *J. Antibiot.* **2001**, *54*, 642–649. [[CrossRef](#)]
83. Bannantine, J.P.; Lingle, C.K.; Adam, P.R.; Ramyar, K.X.; McWhorter, W.J.; Stabel, J.R.; Picking, W.D.; Geisbrecht, B.V. NlpC/P60 domain-containing proteins of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* that differentially bind and hydrolyze peptidoglycan. *Protein Sci.* **2016**, *25*, 840–851. [[CrossRef](#)]
84. Gargis, S.R.; Gargis, A.S.; Heath, H.E.; Heath, L.S.; LeBlanc, P.A.; Senn, M.M.; Berger-Bächi, B.; Simmonds, R.S.; Sloan, G.L. Zif, the Zoocin A Immunity Factor, Is a FemABX-Like Immunity Protein with a Novel Mode of Action. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 6205–6210. [[CrossRef](#)]
85. Sharp, C.; Bray, J.; Housden, N.G.; Maiden, M.C.J.; Kleanthous, C. Diversity and distribution of nuclease bacteriocins in bacterial genomes revealed using Hidden Markov Models. *PLoS Comput. Biol.* **2017**, *13*, e1005652. [[CrossRef](#)]
86. Schatz, A.; Bugie, E.; Waksman, S.A.; Hanssen, A.D.; Patel, R.; Osmon, D.R. The Classic: Streptomycin, a Substance Exhibiting Antibiotic Activity against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2005**, *437*, 3–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Gomes-Pepe, E.S.; Schuch, V.; de Macedo Lemos, E.G. Biotechnology of polyketides: New breath of life for the novel antibiotic genetic pathways discovery through metagenomics. *Braz. J. Microbiol.* **2013**, *44*, 1007–1034. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Qin, Z.; Devine, R.; Hutchings, M.I.; Wilkinson, B. A role for antibiotic biosynthesis monooxygenase domain proteins in fidelity control during aromatic polyketide biosynthesis. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 3611. [[CrossRef](#)]

Capítulo 3

*Metagenome Assembled Genome (MAG) da cultura mista 38-XC4, isolada do peixe *Caranx latus* (Xerelete), que é altamente antagônica a patógenos humanos.*

CAPÍTULO 3

Metagenome Assembled Genome (MAG) da cultura mista 38-XC4, isolada do peixe *Caranx latus* (xerelete), que é altamente antagônica a patógenos humanos.

3.1 - Introdução

Este tópico será uma breve introdução da cultura mista 38-XC4, apresentando o histórico da mesma, como a tentativa de isolamento realizada em Silva (2018). As populações que compõem as comunidades microbianas exibem diversos tipos de interações, essas podem ser benéficas ou não. Estas populações podem interagir e cooperar entre si, favorecendo o crescimento e desenvolvimento das mesmas. Neste capítulo, está apresentada a cultura mista 38-XC4, que é a interação entre as bactérias da espécie *Aeromonas salmonicida* e *Acinetobacter pittii*, da qual, juntas podem inibir estirpes patogênicas, apresentando espectro de ação voltado para *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*.

A princípio considerava-se que esta era uma cultura pura contendo apenas a espécie *Aeromonas salmonicida*. Para realizar o sequenciamento genômico da estirpe AE38-XC4, a bactéria foi cultivada em 04 mL de água peptona-alcálica, por 24 horas à 28°C. Esse processo foi realizado para eliminar uma quantidade significativa de bactérias de outros gêneros e preservar as bactérias do gênero *Aeromonas*. Após esse processo, essas bactérias foram semeadas em placas com o meio GSP (*Glutamate Starch Phenol Red Agar* / ágar amido glutamato vermelho de fenol) contendo 100µL de penicilina (antibiótico) para 100 mL de meio, pelo período de 48 horas de incubação, à temperatura de 28°C. No meio GSP, as colônias do gênero *Aeromonas* são capazes de acidificar o meio e fazê-lo mudar de cor, indo do vermelho para o amarelo. Isso ocorre porque o gênero *Aeromonas* degrada o amido presente no meio GSP. Este meio tem como nutriente o amido e o glutamato e muitos microrganismos não conseguem metabolizar esses compostos, tornando assim, esse meio seletivo para *Aeromonas* e *Pseudomonas*. As características para ambas são: *Aeromonas* neste meio possuem colônias grandes de diâmetro de 2-3mm, com a coloração amarela, rodeado por uma zona amarela, devido à acidificação do meio. Já as bactérias do gênero *Pseudomonas* possuem colônias grandes

de diâmetro de 2-3mm de coloração azul-violeta, cercado por uma zona vermelho-violeta; *Enterobacteriaceae* e outras bactérias possuem colônias geralmente pequenas, com crescimento atrasado e às vezes aspecto mucóide (Merck, 2008). Sendo assim, a colônia com morfologia característica para o gênero *Aeromonas* (coloração amarela) foi selecionada.

Apesar dessa etapa, a bactéria estudada como *Aeromonas salmonicida*, nomeada de AE38-XC4 na dissertação de Silva, 2018, foi analisada *in silico* e revelou-se como uma cultura mista. A cultura mista foi esgotada em diferentes meios de culturas específicos para os gêneros *Aeromonas* e *Acinetobacter*, porém ainda permaneceram como uma cultura mista. Também foram analisadas por microscopia (Figura II - Apêndice), e as células de ambas as culturas se assemelham, sendo bacilos curtos. Então a cultura foi tratada como um metagenoma e seus genomas foram montados separadamente *in silico*, para a busca de genes que possam estar envolvidos na produção de substâncias antimicrobianas.

3.2 - Material e Métodos

A Figura 14 apresenta a metodologia utilizada no capítulo 3, o qual faz a análise da cultura mista 38-XC4.

CAPÍTULO 3: MAG DA CULTURA MISTA 38-XC4

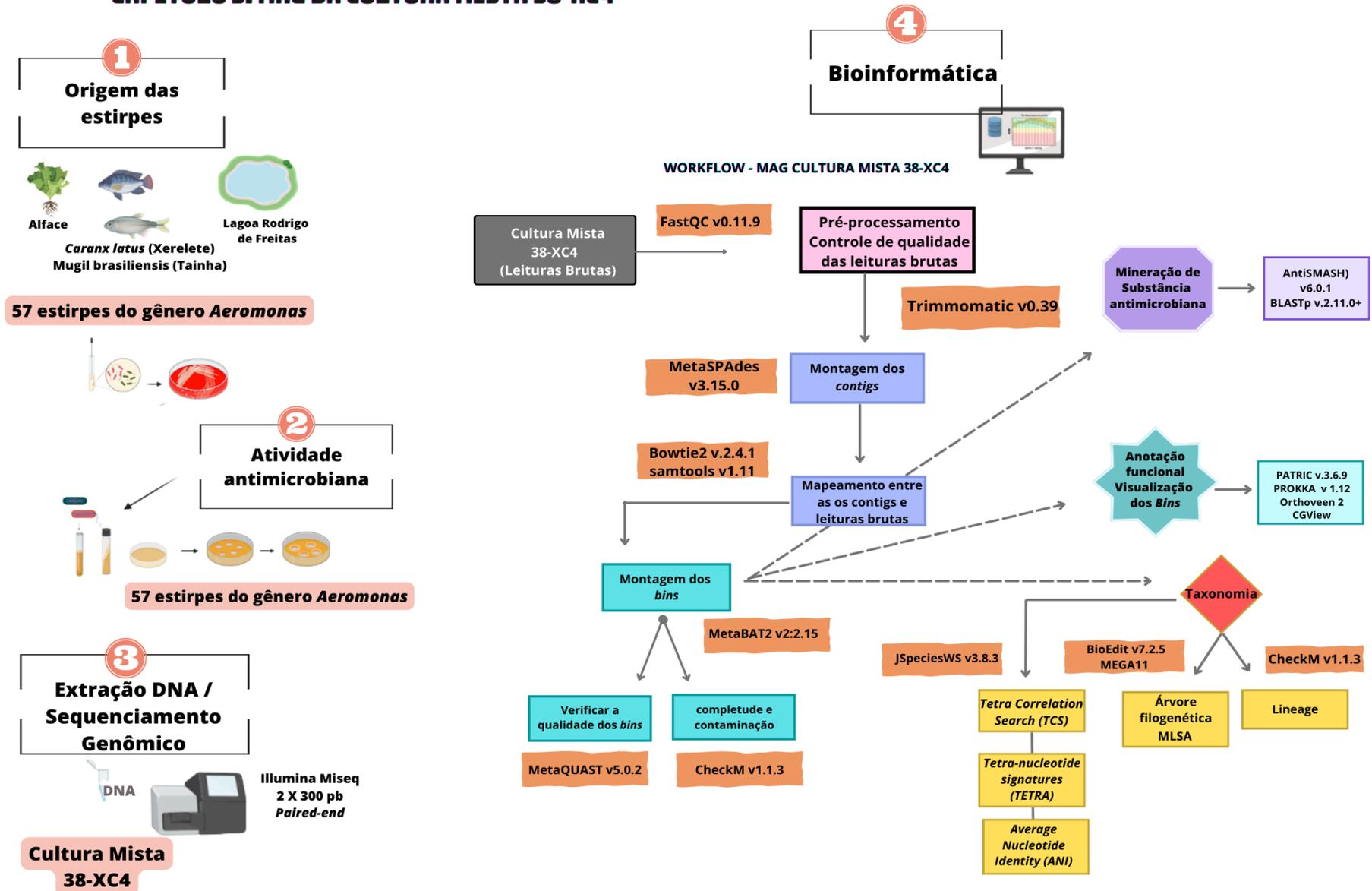


Figura 14: Representação dos materiais e métodos utilizados no capítulo 3. Figura feita com a ferramenta BioRender e Canva.

3.2.1 Cultura mista 38-XC4, atividade antimicrobiana e espectro de ação

Assim como a estirpe AE59-TE2, a cultura mista 38-XC4 também é oriunda da coleção de culturas do Laboratório de Genética de Microrganismos Associados a Alimentos e à Indústria (LGMAI) e está entre as 57 bactérias isoladas de brânquias, escamas e ânus de peixes de feira-livre e da Lagoa Rodrigo de Freitas testadas para verificar a atividade antimicrobiana. Ela foi a segunda cultura selecionada dentre as 38 bactérias que apresentaram atividade antimicrobiana contra estirpes patogênicas. A cultura mista 38-XC4 foi isolada de peixe da espécie: *Caranx latus*, de nome popular Xerelete, coletado de feira-livre localizada no bairro Vila Isabel, cidade do Rio de Janeiro, RJ, Brasil (-22.910468, -43.240857).

3.2.2 Extração de DNA e sequenciamento Illumina

Para realizar a extração de DNA, a cultura mista 38-XC4 foi incubada em água peptonada alcalina (APA) a 30°C por 24h e então foi cultivada por esgotamento em meio seletivo GSP (Merck, Alemanha) a 30°C por 48h. Após o tempo de incubação, uma colônia isolada com a coloração amarela, típica do cultivo do gênero *Aeromonas* em meio GSP, foi selecionada para executar a extração de DNA. O método utilizado para efetuar a extração de DNA foi o CTAB (Ausubel *et al.*, 1997). Para o sequenciamento do genoma completo (WGS, do inglês *Whole Genome Sequencing*) a plataforma MiSeq Illumina (Rio de Janeiro, Brasil) foi selecionada. Para isso, foi utilizado 1 µg de gDNA para construir a biblioteca *paired-end* (2 × 300 pb) com o kit de Preparação de Amostras de DNA Nextera XT (Illumina, SanDiego, CA, EUA).

3.2.3 Processamento de dados e montagem dos *contigs* e *bins* pela técnica *Metagenome assembled Genome* (MAG) e diagrama do mapa circular dos *bins*

As leituras brutas geradas pelo sequenciador foram analisadas pela ferramenta FastQC v0.11.9 (Andrews, 2010), podendo assim verificar a qualidade do sequenciamento. O corte de qualidade foi feito com a ferramenta Trimmomatic v0.39 (Bolger *et al.*, 2014), a qual foi usada para fazer o controle de qualidade das leituras com um índice de qualidade Phred >30, removendo adaptadores, bases indefinidas (N) e leituras pequenas (<36 pb). Após a limpeza das leituras pelo filtro de qualidade, a ferramenta MetaSPAdes v3.15.0 (Bankevich *et al.*, 2012) foi usada para montar os *contigs*. Além de montar os *contigs*, a técnica de *Metagenome Assembled Genome*

(MAGs) foi empregada para separar as sequências em *bins*. Para isso, foi necessário fazer o mapeamento entre as sequências oriundas da montagem dos *contigs* e as leituras brutas geradas pelo sequenciamento, esta etapa foi realizada pela ferramenta Bowtie2 v.2.4.1 (Langmead & Salzberg, 2012) e Samtools v1.11 (Li *et al.*, 2009), as quais geraram um arquivo no formato (.bam). Para a montagem dos *bins* foi utilizada a ferramenta MetaBAT2 v2:2.15 (Kang *et al.*, 2019).

Para verificar a qualidade da montagem e dos *bins* foram empregadas as ferramentas MetaQUAST v5.0.2 (Mikheenko *et al.*, 2018), que gera as métricas da montagem e a ferramenta CheckM v1.1.3 (Parks *et al.*, 2014) que verificar a completude e contaminação dos *bins*. Os dois *bins* foram plotados com a ferramenta *Circular Genome Viewing* (CGView) (Grant & Stothard, 2008).

3.2.4 Taxonomia e arquivo consenso das sequências do gene que codificam o rRNA 16S

Muitas vezes, durante a montagem dos *bins* pela técnica *Metagenome Assembled Genome* (MAG), não há a presença do gene que codifica o rRNA 16S. Isso pode ocorrer devido ao gene que codifica o rRNA 16S ser conservado e repetitivo, sendo difícil classificá-lo no momento de formar os *bins* (Nayfach *et al.*, 2019; Vosloo *et al.*, 2021). Por isso, ao finalizar a montagem dos *bins*, pode-se observar que esse gene não estava presente nos arquivos montados e sim estavam em arquivos separados. Para solucionar esse problema, após as análises preliminares de identificação das espécies de estudo, foi necessário adicioná-los manualmente em suas determinadas montagens.

Foi gerado um arquivo consenso das sequências do gene que codifica o 16S rRNA e este foi adicionado em cada arquivo *bin* fasta. Para isso, o genoma representativo de cada *bin* foi baixado do NCBI e então, a ferramenta Barrnap v0.9 (Seemann, 2013) foi executada para encontrar as sequências do gene que codifica o rRNAs 16S. O próximo passo foi realizar o mapeamento entre o gene que codifica o rRNA 16S de cada genoma representativo e as leituras brutas da nossa cultura mista, esta etapa foi feita com as ferramentas Bowtie2 v.2.4.1 (Langmead & Salzberg, 2012) e samtools v1.11 (Li *et al.*, 2009), gerando o arquivo no formato bam para cada genoma de estudo. O arquivo no formato (.bam) foi convertido em vcf (do inglês, *Variant Call*), que é um formato de chamada de variante, e assim, o consenso foi gerado pela ferramenta BCFtools v1.9 (Danecek *et al.*, 2021).

Como mencionado anteriormente, foi realizada uma identificação preliminar de cada *bin*, que foi feita com a ferramenta CheckM v1.1.3 (Parks *et al.*, 2014), pelo uso do parâmetro de linhagem. Outras análises foram empregadas pelo uso da plataforma online JSpeciesWS v3.8.3 (Richter *et al.*, 2016). A análise de correlação de tetranucleotídeo (TCS, do inglês *Tetra Correlation Search*) v3.8.3, que se baseia nas frequências de tetranucleotídeos e no coeficiente de correlação, utilizando o genoma de estudo contra todos os genomas de referência contidos no banco de dados (*GenomesDB*) da plataforma. A análise de índice de correlação de assinatura de tetranucleotídeo (TETRA, do inglês *Correlation indexes of their Tetra-nucleotide signatures*), que faz a análise estatística e sem alinhamento de padrões de uso de Tetranucleotídeos. Por último nesta plataforma, a análise de identidade nucleotídica média (ANI, do inglês *Average Nucleotide Identity*) foi realizada para verificar a probabilidade de genomas pertencerem à mesma espécie. Essas duas últimas análises utilizam o genoma de estudo e genomas selecionados pelo usuário, podendo ser adicionados manualmente ou pelo próprio banco de dados do servidor.

Assim como para o genoma AE59-TE2, também foi gerada uma árvore para cada genoma oriundo do 38-XC4 por meio da técnica *multilocus sequence analysis* (MLSA). Sendo que para a amostra **AE38-XC4** foram utilizados os seguintes genes de manutenção (HK, do inglês *Housekeeping Genes*) *recA*, *gyrB*, *gltA*, *metG*, *groL* e 16S rRNA (Colston *et al.*, 2014) e os genomas utilizados foram apresentados na Tabela 6. Como grupo externo para enraizar a árvore foi utilizado o genoma *Oceanimonas doudoroffi* ATCC 27123. Já para a amostra **ACP38-XC4** foram utilizados os genes *gltA*, *gyrB*, *gcd*, *recA*, *groL*, *pgi*, *rpoD* e 16S rRNA (Bartual *et al.*, 2005) com os genomas apresentados na Tabela 7. Como grupo externo foi utilizado o genoma da bactéria *Moraxella catarrhalis* NCTC 11020.

Todos os genomas foram anotados com a ferramenta *Rapid Prokaryotic Genome Annotation* (PROKKA) v1.14.6 (Seemann, 2014) e as sequências de cada gene foram concatenadas para construir “supergenes”. Foi realizado um alinhamento múltiplo de sequências, no qual as lacunas (*GAPS*) foram removidas pelo uso da ferramenta BioEdit v7.2.5 (Hall *et al.*, 1999). As análises filogenéticas foram feitas usando o *software* MEGA11 (Tamura *et al.*, 2021). Uma árvore filogenética foi inferida usando o método máxima verossimilhança (ML, do inglês *Maximum Likelihood*) e o modelo *General Time Reversible* (GTR). A distribuição gamma discreta foi usada para modelar diferenças de

taxa evolutiva entre sítios, permitindo que alguns sítios fossem evolutivamente invariáveis. O teste de *bootstrap* foi realizado com 1000 réplicas.

Tabela 6: Informações das estirpes tipo do gênero *Aeromonas* (MAG2- *Aeromonas salmonicida* AE38-XC4) utilizadas para gerar a árvore filogenética pela análise MLSA.

Estirpe Tipo	NCBI ID
<i>A. allosaccharophila</i> CECT 4199	GCA_000819685.1
<i>A. aquatica</i> AE235	GCA_000764655.1
<i>A. australiensis</i> CECT 8023	GCA_000819725.1
<i>A. bestiarum</i> CECT 424227	GCA_000819745.1
<i>A. bivalvium</i> CECT 7113	GCA_000819765.1
<i>A. caviae</i> CECT 838	GCA_018360005.1
<i>A. dhakensis</i> CIP 1077500	GCF_000820305.1
<i>A. diversa</i> CECT 4254	GCA_000819805.1
<i>A. encheleia</i> CECT 4342	GCA_000819825.1
<i>A. enteropelogenes</i> CECT 4487	GCA_000819845.1
<i>A. eucrenophila</i> CECT 4224	GCA_000819865.1
<i>A. finlandensis</i> 4287 CECT 8028T	GCA_000764645.1
<i>A. fluvialis</i> LMG 24681	GCA_000819885.1
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> ATCC 7966	GCA_000014805.1
<i>A. jandaei</i> CECT 4228	GCA_000819955.1
<i>A. lacus</i> AE122	GCA_000764665.1
<i>A. media</i> CECT 4232	GCA_000819985.1
<i>A. piscicola</i> LMG 24783	GCA_000820005.1
<i>A. popoffii</i> CIP 105493	GCA_000820025.1
<i>A. rivuli</i> DSM 22539	GCA_020149575.1
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i> NBRC 13784	GCA_000647955
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>pectinolytica</i> 34mel	GCA_002735225.1
<i>A. sanarellii</i> LMG 24682	GCA_000820085.1
<i>A. simiae</i> CIP 107798	GCA_000820125.1
<i>A. sobria</i> CECT 4245	GCA_000820145.1
<i>A. taiwanensis</i> LMG 24683	BAWK01000004
<i>A. tecta</i> CECT 7082	GCA_000820185.2
<i>A. veronii</i> CECT 4257	GCA_000820225
<i>Oceanimonas doudoroffi</i> ATCC 27123	GCA_002242685.1

Tabela 7: Informações das estirpes tipo do gênero *Acinetobacter* (MAG1- *Acinetobacter pittii* ACP38-XC4) utilizadas para gerar a árvore filogenética com a análise MLSA.

Estirpe Tipo	NCBI ID
<i>A. albensis</i> ANC 4874	GCF_900095025.1
<i>A. apis</i> ANC 5114	GCF_900197575.1
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	GCF_009035845.1
<i>A. bereziniae</i> LMG 1003	GCF_000368925.1
<i>A. bouvetii</i> DSM 14964	GCF_018324105.1
<i>A. brisouii</i> CIP 110357	GCF_000488275.1
<i>A. calcoaceticus</i> DSM 30006	GCF_000248175.1
<i>A. cumulans</i> WCHAc 060092	GCF_003024525.3
<i>A. equi</i> 114	GCF_001307195.1
<i>A. geminorum</i> J00019 DSM 111094	GCF_013009345.1
<i>A. guerrae</i> AC1271	GCF_003611455.1
<i>A. haemolyticus</i> CIP 64.3	GCF_003323815.1
<i>A. halotolerans</i> R160	GCF_004208515.1
<i>A. johnsonii</i> CIP 64.6	GCF_000368045.1
<i>A. junii</i> CIP 64.5	GCF_000368765.1
<i>A. lactucae</i> NRRL B-41902	GCF_001605885.1
<i>A. nosocomialis</i> NIPH 2119	GCF_000368085.1
<i>A. oleivorans</i> DR1	GCF_000196795.1
<i>A. pittii</i> ATCC 19004	GCF_000369045.1
<i>A. proteolyticus</i> NIPH 809	GCF_000367945.1
<i>A. radioresistens</i> DSM 6976	GCF_000248115.1
<i>A. schindleri</i> CIP 107287	GCF_000368625.1
<i>A. seifertii</i> NIPH 973	GCF_000368065.1
<i>A. septicus</i> AK001 DSM 19415	GCF_019355975.1
<i>A. soli</i> CIP 110264	GCF_000368705.1
<i>A. terrestris</i> ANC 4471	GCF_004331155.1
<i>A. ursingii</i> DSM 16037	GCF_000248135.1
<i>A. variabilis</i> NIPH 2171	GCF_000369625.1
<i>Moraxella catarrhalis</i> NCTC 11020	GCF_900476075.1

3.2.5 Anotação funcional e comparação dos *bins* com os genomas de referência

A anotação dos *bins* foi realizada com a ferramenta PROKKA: *Rapid Prokaryotic Genome Annotation* v 1.12 (Seemann, 2014), utilizando o parâmetro “--metagenome”. Com o mesmo propósito também foi utilizada a ferramenta *Pathosystems Resource Integration Center* (PATRIC) v.3.6.9 (Brettin *et al.*, 2015; Davis *et al.*, 2020) que permite a interação por interface gráfica, para analisar o genoma. Genomas representativos do NCBI para cada espécie foram selecionados e então foi realizada a anotação funcional com a mesma ferramenta utilizada para os *bins*. Os genomas representativos foram: *Acinetobacter pittii strain* PHEA-2 (Acesso NCBI: GCA_000191145.1) e *Aeromonas salmonicida strain* SRW-OG (Acesso NCBI: GCA_012931585.1). Após, os genomas representativos e o *bins* gerados neste trabalho foram comparados com a ferramenta OrthoVenn 2 (Xu *et al.*, 2019), para verificar o número de *clusters* e proteínas de cada genoma. As ferramentas KEGG *Automatic Annotation Server* (KAAS) (Moriya *et al.*, 2007) e KEGG *Mapper Reconstruction* (Kanehisa & Sato, 2020) foram utilizadas para fazer a atribuição de ortologia e o mapeamento das vias metabólicas, os gráficos dessa análise foram gerados pelo uso da ferramenta R (R Core Team, 2022). A busca por sequências de plasmídeos foi realizada pela ferramenta PlasmidFinder 2.1 (Carattoli & Hasman, 2020).

3.2.6 Mineração de genes relativos à atividade antimicrobiana

Para buscar genes relacionados à produção de substâncias antimicrobianas, alguns métodos foram empregados. A ferramenta *Antibiotics and Secondary Metabolite Analysis Shell* (AntiSMASH) v6.0.1 (Medema *et al.*, 2011; Blin *et al.*, 2021; <https://antismash.secondarymetabolites.org/#!/start>) fez a anotação de metabólitos secundários e a busca por bacteriocina. Além de comparar os genomas, a ferramenta OrthoVenn 2 (Xu *et al.*, 2019), também foi utilizada para realizar a busca por proteínas de interesse que estejam relacionadas com a produção de substâncias antimicrobianas. Para isso, foram utilizadas as seguintes palavras-chaves: bacteriocina, antibiótico, colicina, microcina, endopeptidase, endonuclease, policetídeos (PKS) e ramnolipídios. As ferramentas KEGG *Automatic Annotation Server* (KAAS) (Moriya *et al.*, 2007) e KEGG *Mapper Reconstruction* (Kanehisa & Sato, 2020) também foram utilizadas para verificar as vias relacionadas à produção de substâncias antimicrobianas.

Para uma busca mais ampla das proteínas relacionadas a bacteriocinas, a ferramenta BLASTp v.2.11.0+, última atualização 03/11/2020 (Altschul *et al.*, 1990) foi utilizada com os bancos de dados oriundos das ferramentas *Bacteriocin Genome Mining tool* (BAGEL) classe III com a versão mais atual do banco de dados atualizado no dia 21 de dezembro de 2021 (Van Heel *et al.*, 2013), BACTIBASE com a última atualização do banco de dados realizada no dia 20 de maio de 2017 (Hammami *et al.*, 2010) e algumas proteínas de produção de bacteriocinas, como a de produção da zoocina (ZooA) e a de produção da colicina V (Cvpa) oriundas do banco de dados do servidor UniProt (UniProt consortium, 2021). Todos esses bancos de dados foram utilizados contra a anotação dos genomas (fasta aminoácido /.faa) feita anteriormente com a ferramenta PROKKA v1.14.6 (Seemann, 2014).

3.3 - Resultados

3.3.1 - Cultura mista 38-XC4 e sua atividade antimicrobiana e espectro de ação

A cultura mista 38-XC4 inibiu cinco estirpes clinicamente relevantes, contabilizando bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo elas: *K. pneumoniae* KPC, *K. pneumoniae* ESBL, *K. pneumoniae* ATCC 13883 ESBL, *S. aureus* HIV86a e *S. aureus* ATCC 5538 (Figura 15).

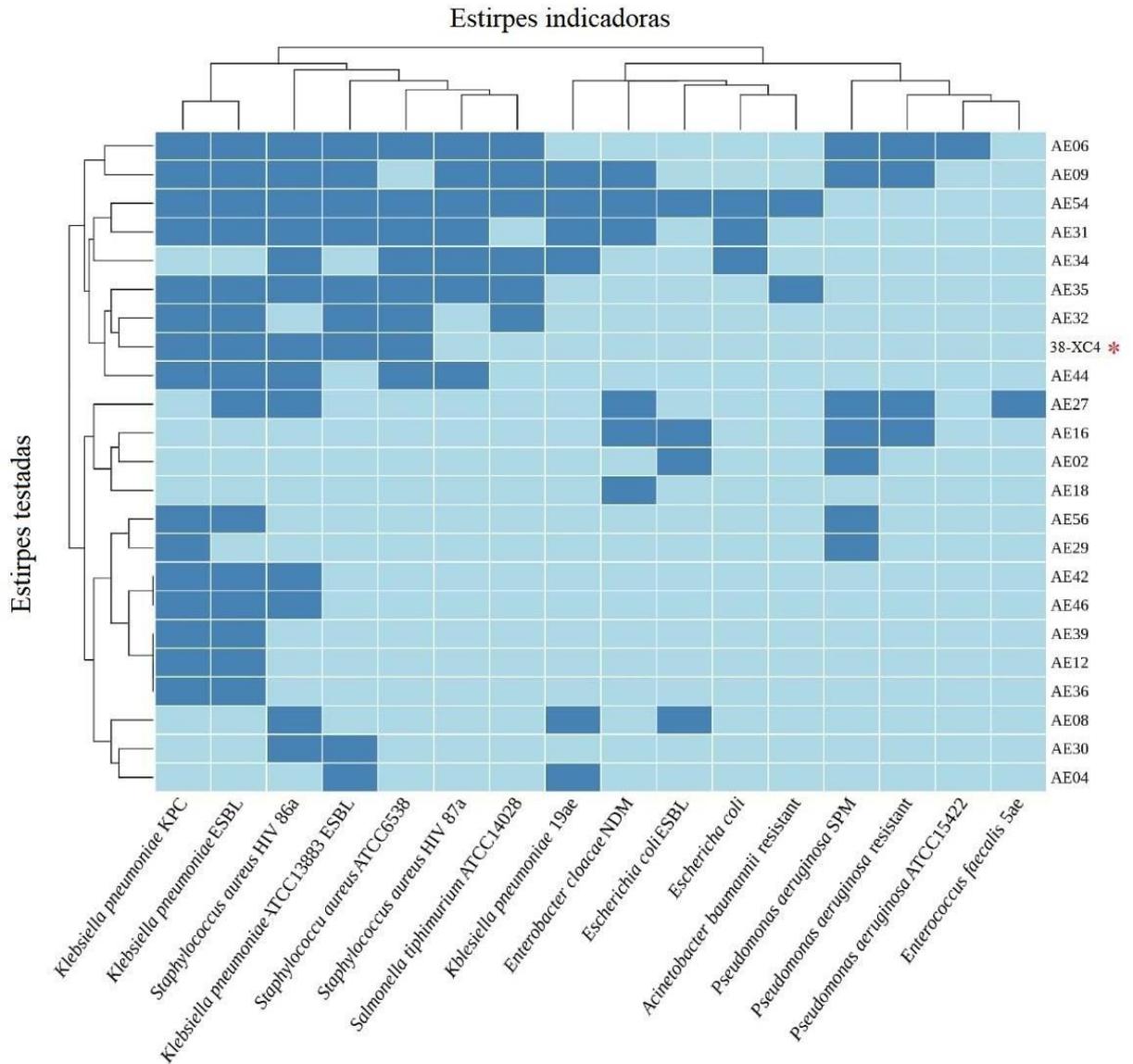


Figura 15: Dendrograma mostrando o resultado do teste de atividade antimicrobiana de 22 estirpes do gênero *Aeromonas* spp. e a cultura mista 38-XC4 contra 16 estirpes indicadoras patogênicas.

3.3.2 - Extração de DNA da 38-XC4 e sequenciamento dos genomas

O sequenciamento *paired-end* com a plataforma Illumina MiSeq resultou em 1.661.394 leituras brutas. Os resultados do sequenciamento estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Dados do sequenciamento e análise original do genoma da estirpe AE38 (cultura mista 38-XC4).

Leituras Brutas	AE38 / 38-XC4	
	R1	R2
# Leituras	1.661.394	1.661.394
Total de bases	310.020.567	327.370.348
Tamanho médio (pb)	186.60 (± 96.07)	197.05 (± 102.36)
%GC	53.83	53.59
# Sequências com N	5.332 (0,33%)	5.426 (0,33%)

3.3.3 - Processamento de dados e montagem dos *contigs* da 38-XC4 e *bins* pela técnica *Metagenome Assembled Genome* (MAG)

O controle de qualidade foi realizado pela ferramenta Trimmomatic, sendo que 1.174.934 leituras passaram pelo filtro de qualidade, sendo 162.460.304 pb para R1 (*forward*) e 144.507.231 bp para R2 (*reverse*) (Tabela 9).

Tabela 9: Métricas das sequências brutas e filtradas da etapa de controle de qualidade da cultura mista 38-XC4.

	Pré-processamento: Controle de qualidade das leituras			
	Leituras brutas		Leituras filtradas	
	R1	R2	R1	R2
#leituras	1,661,394	1,661,394	1,174,934	1,174,934
#Bases (bp)	310.020.567	327.370.348	162.460.304	144.507.231

A ferramenta MetaSPAdes utilizada para montar os *contigs*, resultou em 375 *contigs* com um comprimento total de 8.575.585 bp tendo o maior *contig* o tamanho máximo de 385.946 bp.

Para a montagem dos *bins*, a ferramenta MetaBAT2 v2:2.15 foi utilizada, gerando 2 *bins*. As análises com as ferramentas CheckM e MetaQUAST mostraram que MAG1 tem um tamanho total de genoma de 3.823.853 pb contendo 84 *scaffolds*, sendo que o maior possui 216.891 pb. Além disso, outras métricas foram coletadas, como: N50 com valor de 83.113 pb, L50 com 16 *scaffolds* e o conteúdo G+C com 38,8% (Figura 16). Para MAG2, as análises mostraram resultaram em um tamanho total de genoma de 4.560.861 pb com 50 *scaffolds*, o maior *scaffolds* possuindo o tamanho de 385.946 pb e as métricas N50 com 134.522 pb, L50 com 12 *scaffolds* e o conteúdo G+C de 58,8% (Figura 17). Os resultados de todas as métricas estão presentes na Tabela 10.

Tabela 10: Métricas de montagens do MAG da cultura mista 38-XC4.

Métricas	MetaSPAdes	MetaBAT2	
		MAG 1	MAG 2
<i>Scaffolds</i>	375	84	50
# Tamanho (bp)	8,575,585	3,823,853	4,560,861
Maior <i>contig</i> (bp)	385,946	216,891	385,946
N50	108,003	83,113	134,522
L50	26	16	12
Conteúdo GC%	49,57%	38,80%	58,80%

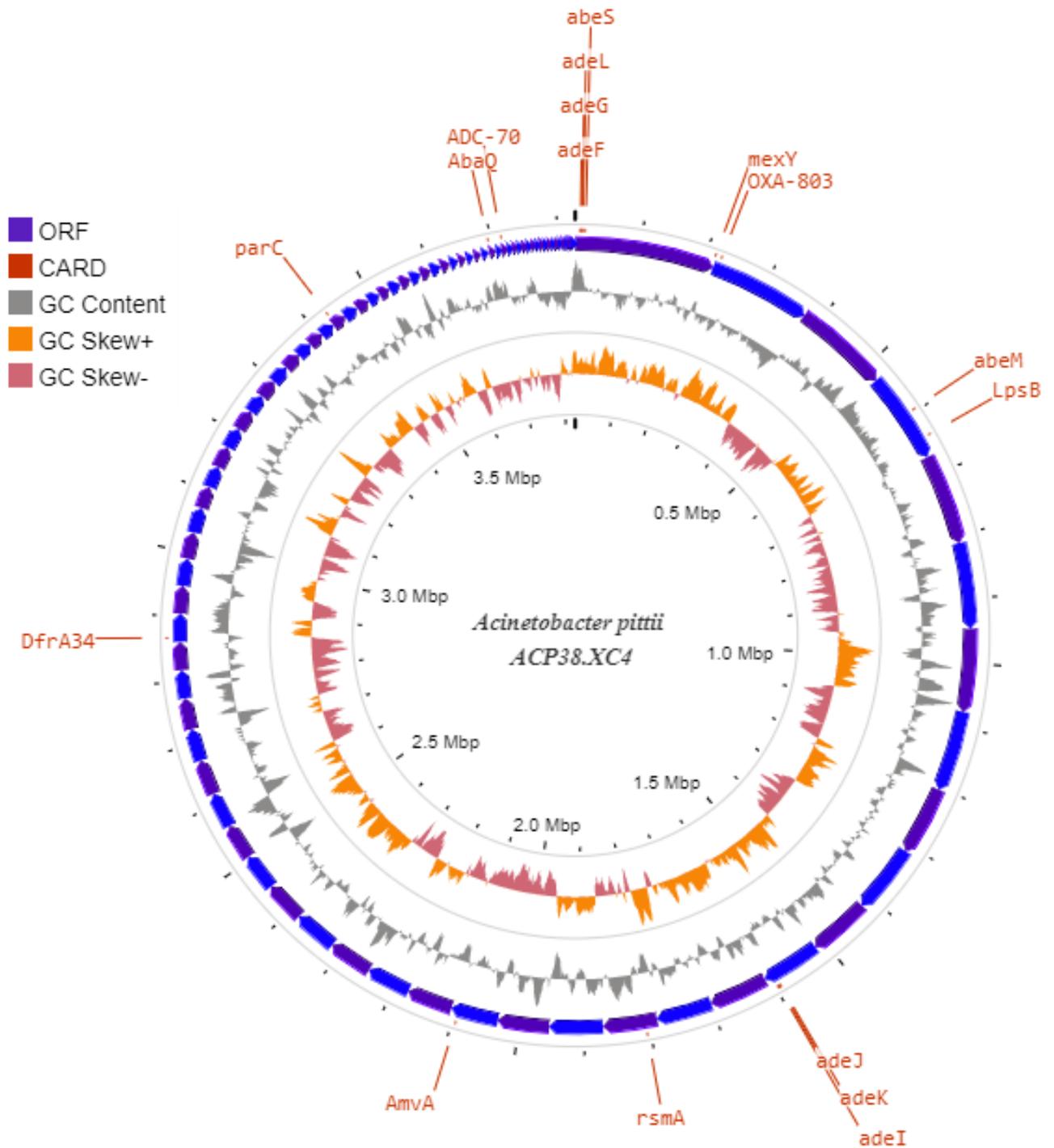


Figura 16: Mapa genômico circular do MAG1, *Acinetobacter pittii* ACP38-XC4, da cultura mista 38-XC4. Os *contigs* foram representados pelas setas nas cores azul e roxo. O círculo cinza é conteúdo G+C; O círculo laranja representa o GC-SKEW na fita positiva e o círculo rosa representa o GC-SKEW na fita negativa. Os genes anotados com a ferramenta CARD são marcados em vermelho.

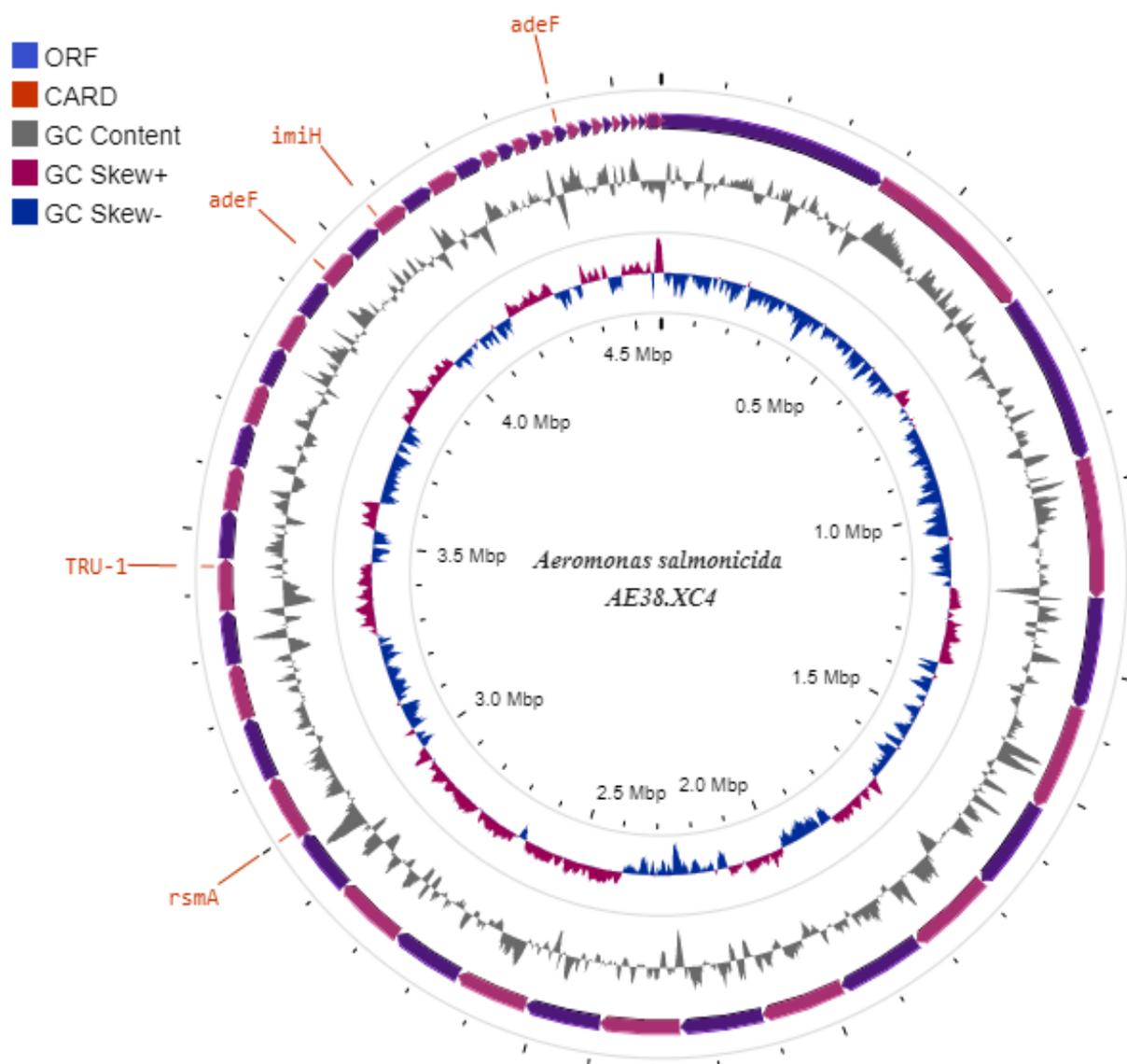


Figura 17: Mapa genômico circular do MAG2, *Aeromonas salmonicida* AE38-XC4, da cultura mista 38-XC4. Os *contigs* foram representados pelas setas nas cores roxo e rosa. O círculo cinza é conteúdo G+C; O círculo rosa representa o GC-SKEW da fita positiva e o círculo azul representa o GC-SKEW da fita negativa. Os genes anotados com a ferramenta CARD estão marcados em vermelho.

3.3.4 - Identificação taxonômica dos bins separados da cultura mista 38-XC4

A identificação preliminar das espécies dos MAGS feita com a ferramenta CheckM resultou em UID4705 g_*Acinetobacter* para o MAG1 e UID4828 g_*Aeromonas* para o MAG2.

A análise ANI para o MAG1 resultou em uma pontuação de 96,54% para a estirpe tipo *Acinetobacter pittii* ATCC 19004 (Figura 18) e para o MAG2 resultou em uma pontuação de 97,06% para a estirpe tipo *Aeromonas salmonicida* subsp. *pectinolytica* 34mel (Figura 19).

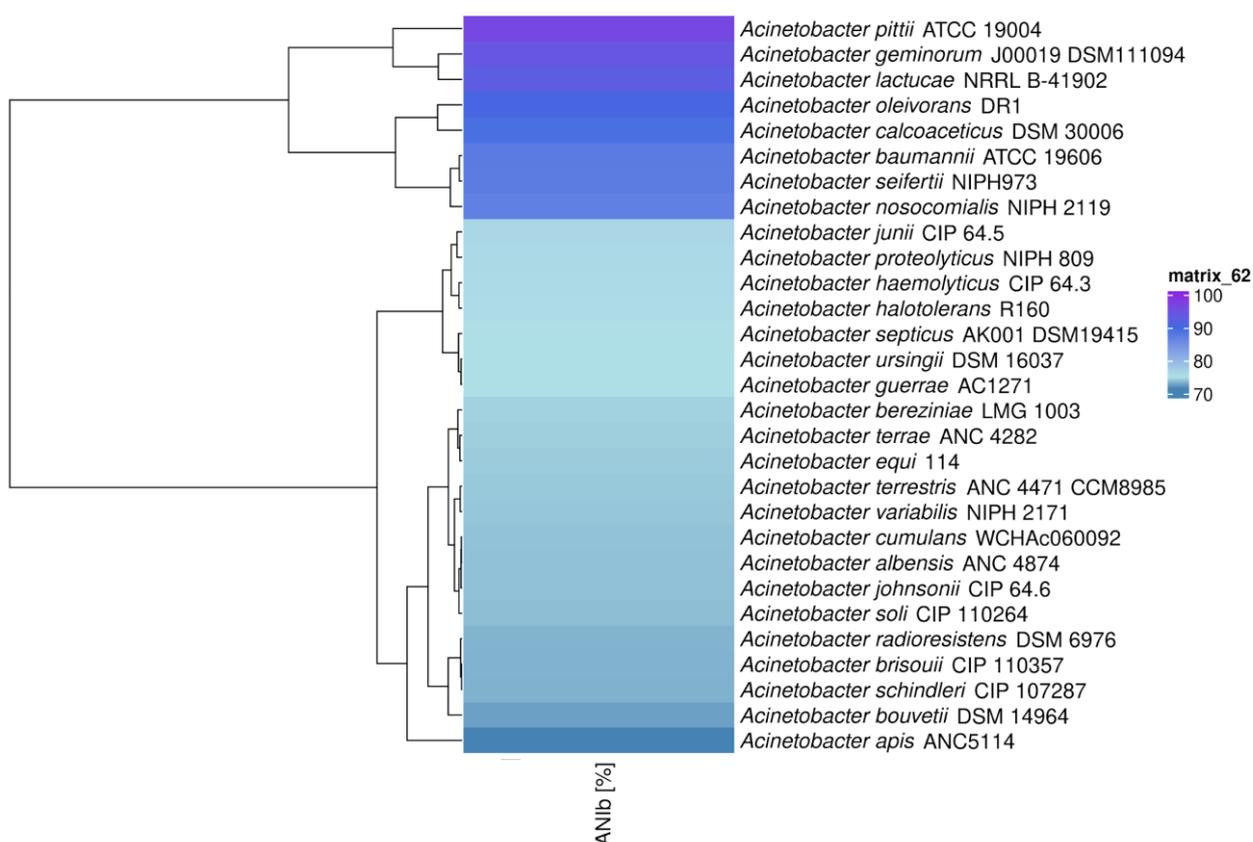


Figura 18: Mapa de calor com os resultados da análise ANI para MAG1, *Acinetobacter pittii* ACP38-XC4, mostrando maior similaridade com a estirpe *Acinetobacter pittii* ATCC 19004, com 96,54%.

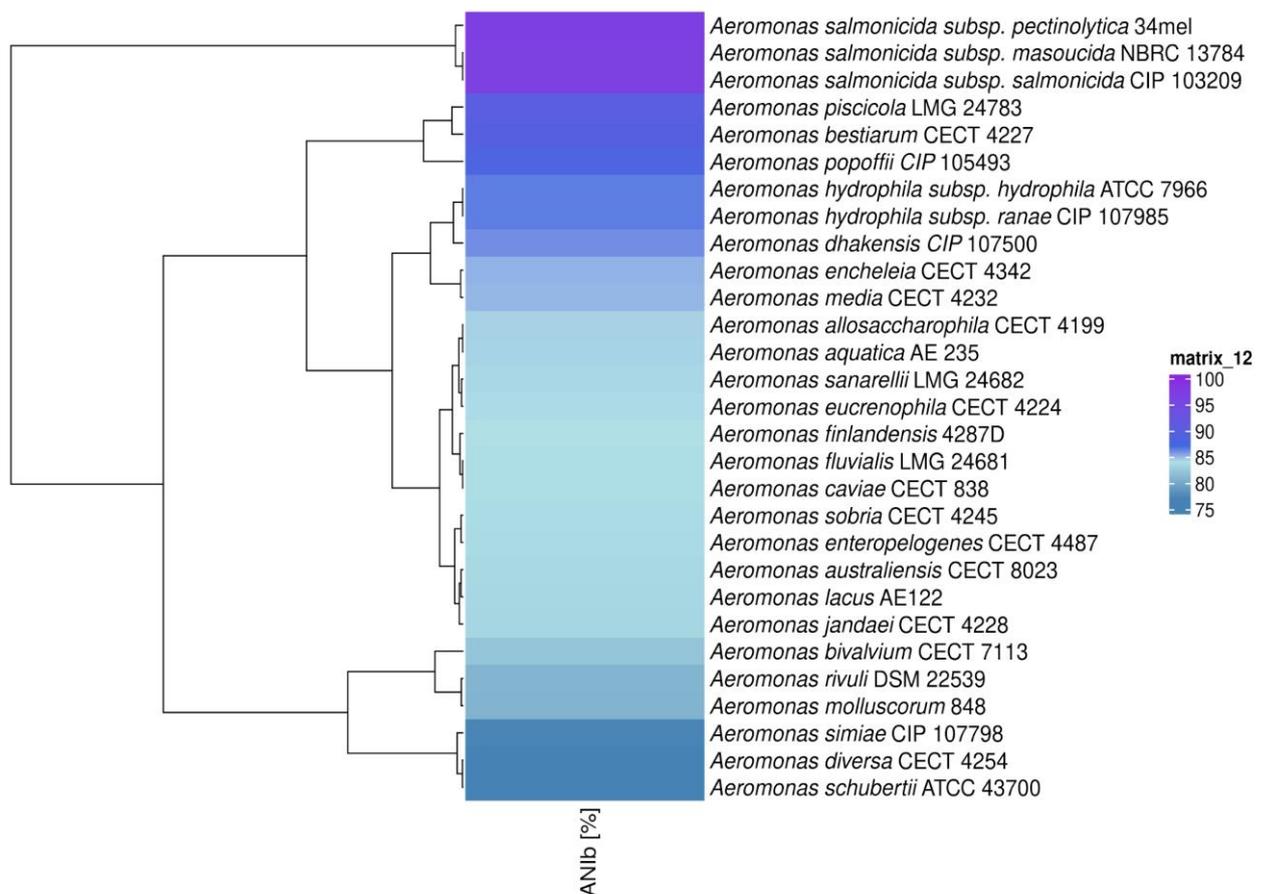


Figura 19: Mapa de calor com os resultados da análise ANI para o MAG2, *Aeromonas salmonicida* AE38-XC4, mostrando que a estirpe de estudo MAG2 é mais semelhante com a estirpe *Aeromonas salmonicida* subsp. *pectinolytica* 34mel, com 97,06%.

A inferência da árvore filogenética MLSA agrupou o MAG1, nomeado de ACP38-XC4, junto com a estirpe tipo *Acinetobacter pittii* (Figura 20). Para o MAG2, a árvore MLSA resultou em um grupo entre a cepa AE38-XC4 e *Aeromonas salmonicida*. (Figura 21). As análises do MLSA corroboram com o resultado preliminar da ANI. Portanto, MAG1 foi denominado *Acinetobacter pittii* ACP38-XC4 e MAG2 foi denominado *Aeromonas salmonicida* AE38-XC4.

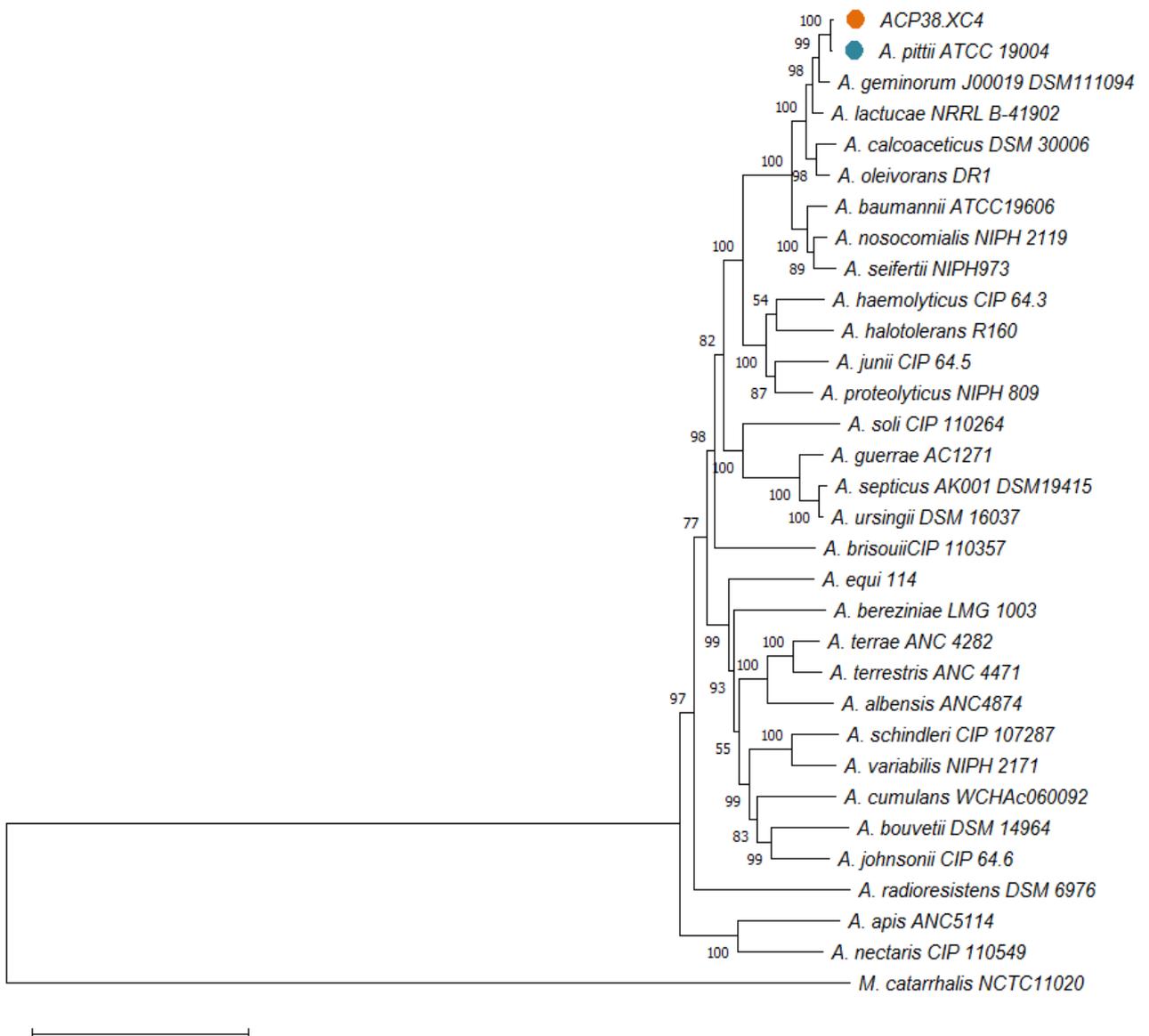


Figura 20: A árvore filogenética da análise MLSA da estirpe *Acinetobacter pittii* ACP38-XC4, usando oito genes de manutenção (*gltA*, *gyrB*, *gcd*, *recA*, *groL*, *pgi*, *rpoD* e *16S* rRNA) e vinte e oito estirpes tipo do gênero *Acinetobacter*. O grupo externo usado foi *Moraxella catarrhalis* NCTC 11020. O método de máxima verossimilhança (ML) e o modelo de tempo geral reversível (GTR, do inglês *General Time Reversible Model*) foram usados para inferir a árvore com uma distribuição Gama discreta (+G) usada para avaliar taxa de variação entre os sítios dos alinhamentos. O teste *bootstrap* foi realizado com 1000 réplicas.

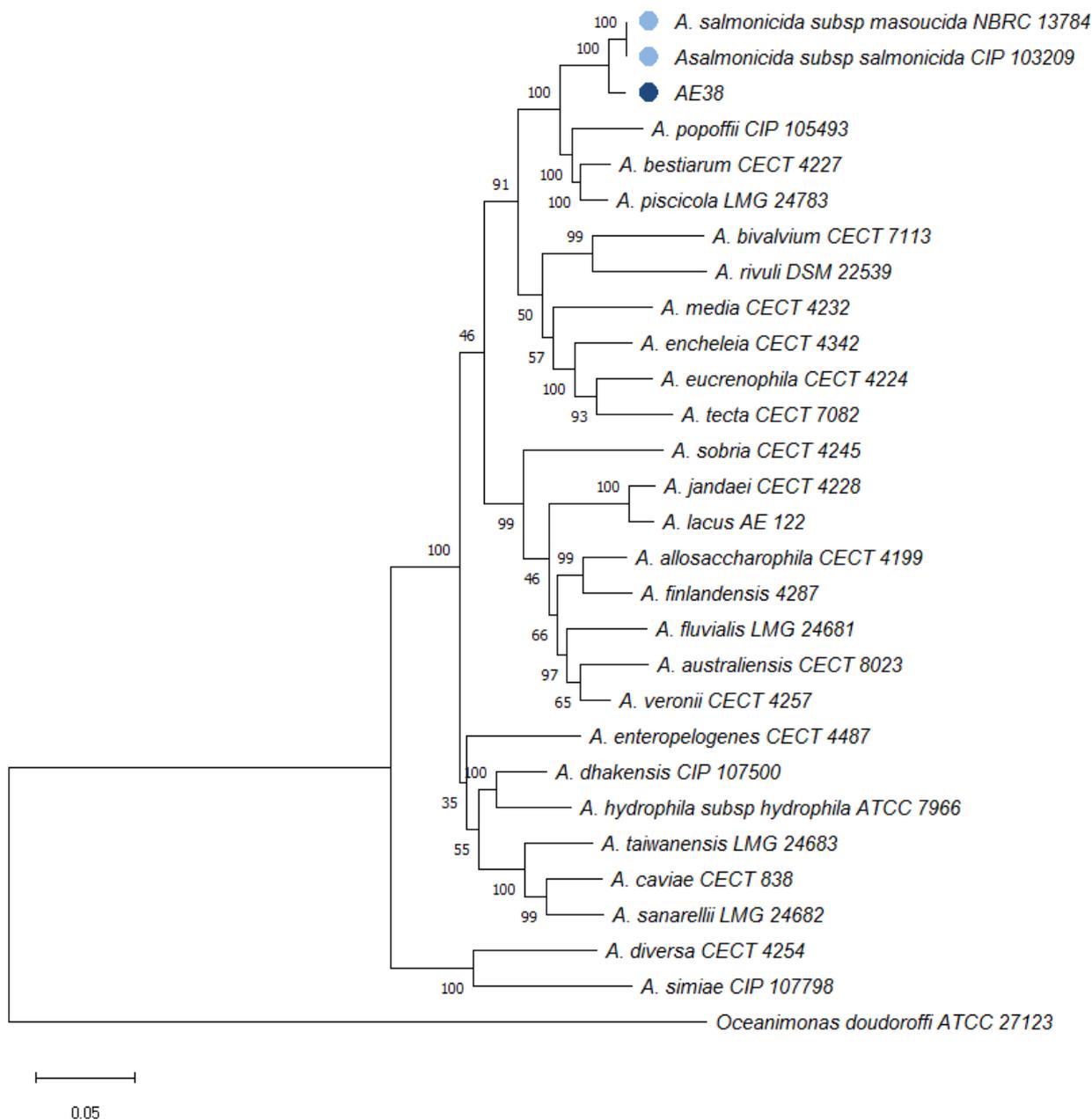


Figura 21: A árvore filogenética da análise MLSA da estirpe AE38-XC4 *Aeromonas salmonicida* usando seis genes de manutenção (*recA*, *gyrB*, *gltA*, *metG*, *groL* e *16S* rRNA), vinte e oito estirpes tipo do gênero *Aeromonas* e uma estirpe do da espécie *Oceanimonas doudoroffii* ATCC 27123, como grupo externo. O método de máxima verossimilhança (ML) e o modelo reversível de tempo geral (GTR, do inglês *General Time Reversible Model*) foram usados para inferir a árvore com uma distribuição Gama discreta foi usada para modelar diferenças de taxa evolutiva entre os sítios, permitindo

que alguns sítios sejam evolutivamente invariáveis. O teste *bootstrap* foi realizado com 1000 réplicas.

3.3.5 Anotação funcional e comparação dos *bins* separados da cultura mista 38-XC4 com os genomas de referência

A anotação funcional com a ferramenta PROKKA para MAG1 *Acinetobacter pittii* ACP38-XC40 identificou 3.637 sequências de codificação (CDS), 0 rRNA, 46 tRNA e 1 tmRNA. Já para o genoma da MAG2 *Aeromonas salmonicida* AE38-XC4, foram anotadas 4.128 sequências de codificação (CDS), 1 rRNA, 64 tRNA e 1 tmRNA.

Além disso, a anotação funcional realizada pela ferramenta PATRIC para MAG1 *Acinetobacter pittii* ACP38-XC4 resultou em 3.744 sequências de codificação (CDS) e 48 tRNAs. O banco de dados *Victors* identificou 6 genes para fatores de virulência, enquanto o VFDB identificou 1 gene. TCDB anotou 27 genes transportadores. O *DrugBank* identificou 10 genes e o TTD 2 genes. A busca por resistência a antibióticos resultou em 42 genes identificados pelo PATRIC, 17 genes anotados pelo CARD e 2 genes descobertos pelo NDARO.

Já para o genoma da MAG2 *Aeromonas salmonicida* AE38-XC4, a ferramenta de anotação do PATRIC, identificou 4.279 sequências de codificação (CDS), 67 tRNAs e 1 rRNA. *Victors* e o VFDB identificaram 26 e 15 genes de fatores de virulência, respectivamente. TCDB anotou 30 genes transportadores. O *DrugBank* identificou 36 genes e o TTD 4 genes. Card identificou 6 genes de resistência a antibióticos, PATRIC revelou 37 genes e NDARO previu 3 genes. Os resultados oriundos da anotação realizada com a ferramenta PATRIC estão disponibilizados na Tabela 11.

Tabela 11: Tabela com os dados da anotação funcional realizada na plataforma PATRIC, utilizando diversas ferramentas.

Ferramentas	MAG1 / ACP38-XC4 <i>Acinetobacter pittii</i>	MAG2 / AE38-XC4 <i>Aeromonas salmonicida</i>
CDS (PATRIC)	3.744	4.279
tRNA (PATRIC)	48	67
Fator de Virulência (<i>Victors</i>)	6	26
Fator de Virulência (VFDB)	1	15
Genes transportadores (TCDB)	27	30
<i>DrugBank</i>	10	36
TTD	2	4
Genes de Resistência (PATRIC)	42	37
Genes de Resistência (CARD)	17	6
Genes de Resistência (NDARO)	2	3

A ferramenta OrthoVenn 2 utilizada para comparar os *bins* montados e os genomas representativos de cada espécie de estudo, resultou em um total de 5.710 *clusters*, 4.573 *clusters* ortólogos e 1.137 *clusters* de genes de cópia única. O total de proteínas, *clusters* e *singletons* estão descritos na Tabela 12.

Tabela 12: Tabela da comparação entre os *bins* e os genomas representativos de cada espécie de estudo, através da ferramenta OrthoVenn 2.

Genomas	# Proteínas	# Clusters	# Singletons
MAG1: <i>A. pittii</i> ACP38-XC4	3,678	3,153	473
<i>A. pittii</i> PHEA-2	3,579	3,159	372
MAG2: <i>A. salmonicida</i> AE38-XC4	4,165	3,749	376
<i>A. salmonicida</i> SRW-OG1	4,126	3,749	322

Em relação ao número de *clusters*, os genomas de *Aeromonas salmonicida* compartilham 3.714 *clusters* iguais e 35 *clusters* diferentes para cada genoma. Já os genomas de *Acinetobacter pittii* compartilham 3.088 *clusters* iguais. O genoma *A. pittii* PHEA-2 possui 20 *clusters* não compartilhados com o MAG2 e o genoma MAG2: *A. pittii* ACP38-XC4 apresenta 65 *clusters* não compartilhados com o genoma de referência.

Ambos os genomas de referências foram comparados, tendo 1.248 *clusters* compartilhados e 1.899 *clusters* apenas no genoma *A. pittii* PHEA-2 e 2.501 *clusters* apenas no genoma *A. salmonicida* SRW-OG1. A comparação realizada entre os MAG1 e MAG2 resultou em: 1.221 *clusters* compartilhados, 1.918 *clusters* para o MAG1- *A. pittii* ACP38-XC4 e 2.528 *clusters* para o MAG2- *A. salmonicida* AE38-XC4 (Figura 22).

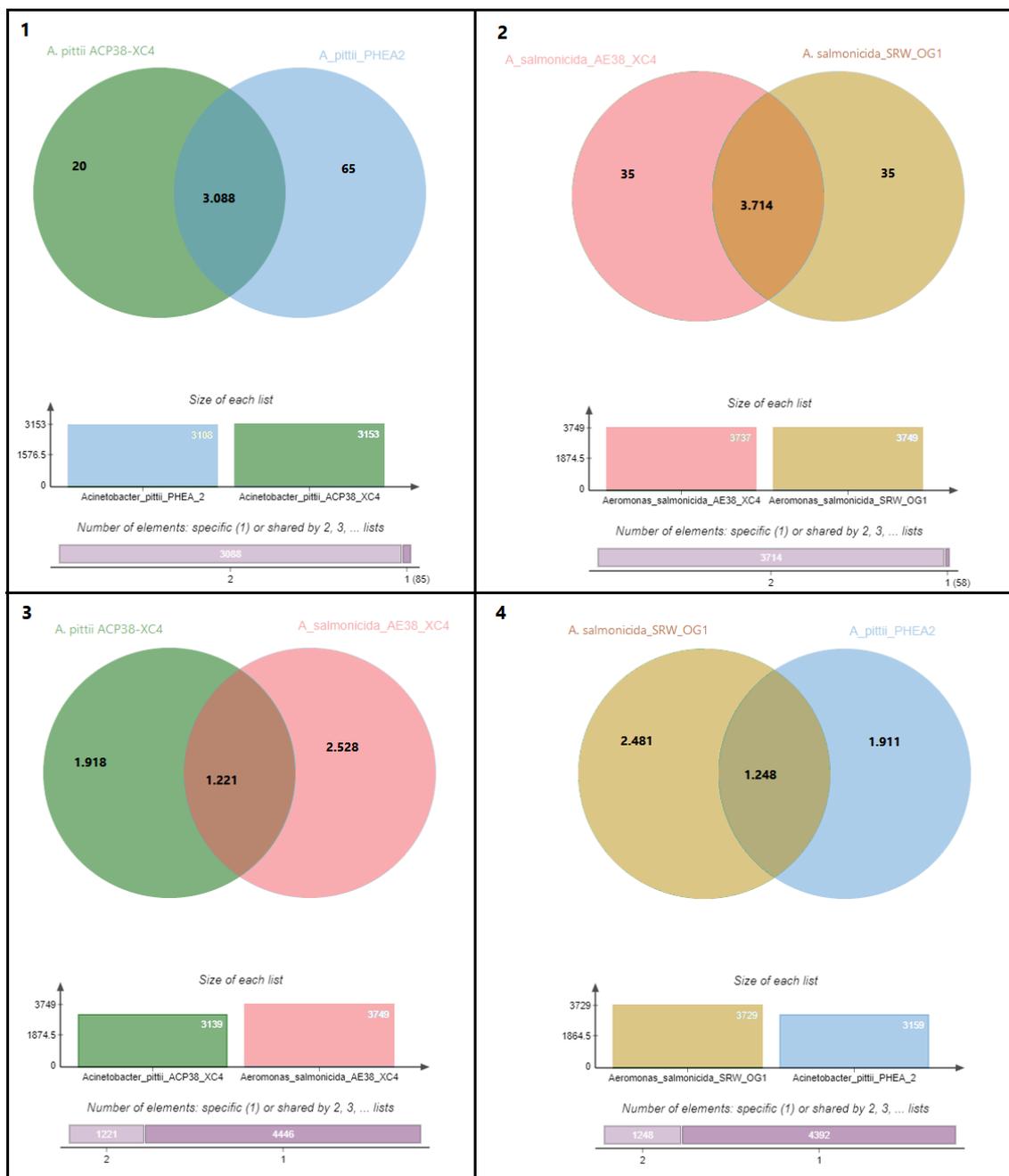


Figura 22: Comparação da distribuição de *cluster* Genoma X Genoma. O primeiro diagrama de Venn representa a comparação com os genomas de *A. pittii*, o segundo representa a comparação entre os genomas de *A. salmonicida*, o terceiro representa a

comparação entre o MAG1- *Acinetobacter pittii* ACP38-XC4 e o MAG2- *Aeromonas salmonicida* AE38-XC4 e o quarto representa a comparação entre os genomas representativos *Acinetobacter pittii* PHEA-2 e *Aeromonas salmonicida* SRW-OG1.

A Figura 23 apresenta a comparação entre os genomas pelos resultados da análise dos *clusters* de ortólogos, pela qual pode-se observar que os genomas MAG1- *Acinetobacter pittii* ACP38-XC4 e o genoma representativo *Acinetobacter pittii* PHEA-2 compartilham 3.159 *clusters*, formando um grupo mais semelhante. Já os genomas MAG2 - *Aeromonas salmonicida* AE38-XC4 e o genoma representativo *Aeromonas salmonicida* SRW-OG compartilham 3.740 *clusters*, sendo semelhantes, formando um outro grupo. Com isso, pode-se concluir que a técnica *Metagenome Assembled Genome* (MAG) foi capaz de separar os dois genomas *in silico*, formando os *bins* de maneira eficiente.

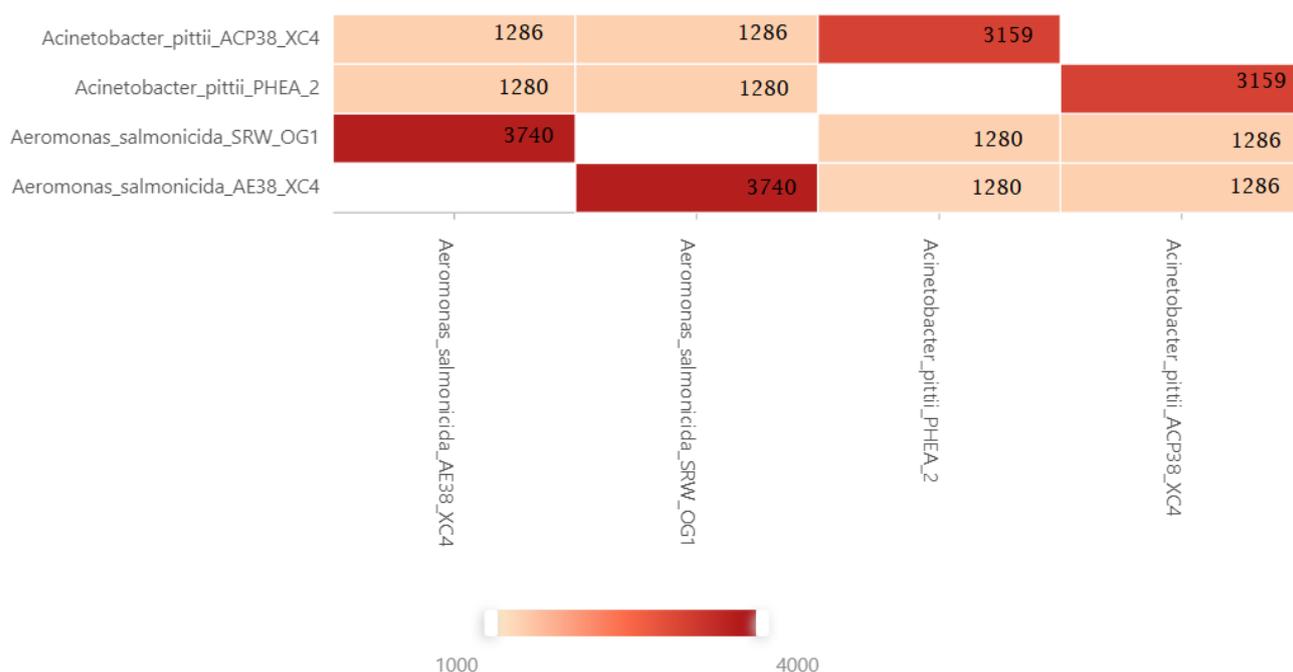


Figura 23: Comparação dos genomas por matriz de similaridade dos ortólogos de *clusters* identificados. O mapa de calor apresenta os grupos ortólogos compartilhados entre os genomas. MAG1- *Acinetobacter pittii* ACP38-XC4; o genoma representativo *Acinetobacter pittii* PHEA-2; MAG2 - *Aeromonas salmonicida* AE38-XC4 e o genoma representativo *Aeromonas salmonicida* SRW-OG.

3.3.6 - Mineração de genes relativos à atividade antimicrobiana

A ferramenta AntiSMASH anotou 6 *clusters* importantes para MAG1-*Acinetobacter pittii* ACP38-XC4, estando relacionados a: inibidor de protease contendo beta-lactona (betalactona); agrupamento de peptídeo sintetase não ribossômica (NRPS, do inglês *Non-ribosomal Peptide Synthetase*) e uma homoserina lactona (Hserlactona); *cluster* de arilpolieno (arylpolyene); sideróforo; produto de cofator redox e peptídeo sintetizado ribossomalmente e modificado pós-traducionalmente (*Ripp-like*, do inglês *Ribosomally Synthesized and Post-Translationally Modified Peptides Like*) (Tabela 13).

Para o *cluster* de NRPS, foi encontrado um gene de biossíntese central e este gene foi analisado no servidor UniProt por BLAST, revelando 99,5% de identidade com o peptídeo sintetase não ribossomal/ gene *dhbF* (Uniprot/ Trembl: F0KJD3) de *A. calcoaceticus* estirpe PHEA-2. Este gene codifica uma enzima para biossíntese do sideróforo bacilibactina.

Ainda analisando os resultados do servidor AntiSMASH, no *cluster* sideróforo foram encontrados dois genes biossintéticos centrais e dois genes relacionados ao transporte. Pelo BLAST realizado no servidor UniProt, pode-se confirmar que esses genes estão relacionados à síntese de aerobactina. Um gene com 65,10% de identidade com o gene *iucC* de *Acinetobacter stercoris*, está envolvido na síntese de aerobactina (Uniprot/Trembl: A0A2U3MZA4), um sideróforo. No *cluster* de outros peptídeos sintetizados ribossomalmente não especificado e modificado pós-traducionalmente (*Other unspecified ribosomally synthesised and post-translationally modified peptide product*, RiPP) (*RIPP-like*) foi anotado um gene central de biossíntese com 94,70% de identidade com o gene *ACIAD0933* / proteína UPF0276. Esta proteína pertence a uma família de proteínas não caracterizada UPF0276 (IPR007801), após a análise com a ferramenta InterProScan.

Tabela 13: Resultado AntiSMASH e BLAST pela ferramenta UniProt para o MAG1 - *Acinetobacter pittii* estirpe ACP38-XC4.

AntiSMASH Cluster	BLAST do UniProt			
	Entrada/ Acesso	Proteína/Gene	Identidade	Organismo
	Trembl/ F0KKW8	Proteína acil-CoA sintetase/ <i>acsF2</i> gene	97,50%	<i>A. calcoaceticus</i> strain <i>PHEA-2</i>
Betalactona	Swiss-prot/ P13703	Hidroximetilglutaril-CoA liase/ <i>mvaB</i>	57,40%	<i>P. mevalonii</i>
NRPS	Trembl/ F0KJD3	Peptídeo não ribossômico sintetase / <i>dhbF</i>	99,50%	<i>A. calcoaceticus</i> estirpe <i>PHEA-2</i>
Hserlactona	Swiss-prot/ B0FLN1	Acil-homoserina-lactona sintetase / <i>abaI</i>	94%	<i>A.baumannii</i>
Arilpolieno	Swiss-prot/ Q02K94	3-oxoacil-[acil-carrier-protein] sintetase 1 / <i>fabB</i>	56,20%	<i>P. aeruginosa</i> estirpe <i>UCBPP-PA14</i>
	Swiss-prot/ Q2G1N1	Estafiloferrina B sintetase / <i>sbnC</i> gene	29,60%	<i>S. aureus</i> estirpe NCTC 8325 / PS 47
Sideróforo	Swiss-prot/ Q2G1M8	2-[(L-alanin-3-ilcarbamoil)metil]-3-(2-aminoetilcarbamoil)-2-hidroxiopropanoato sintetase/ <i>sbnF</i> gene	36,60%	<i>S. aureus</i> estirpe NCTC 8325 / PS 47
	Swiss-prot/ P07780	Pirroloquinolina-quinona sintetase / <i>pqqC</i> gene	99,60%	<i>A. calcoaceticus</i>
	Swiss-prot/ P07781	Proteína de ligação PqqA/ <i>pqqD</i> gene	98,90%	<i>A. calcoaceticus</i>
Redox-cofator	Swiss-prot/ P07782	PqqA peptídeo ciclase / <i>pqqE</i> gene	99%	<i>A. baumannii</i>
RiPP-like	Swiss-prot/ Q6FDN0	UPF0276 proteína / <i>ACIAD0933</i>	79,40%	<i>A. baylyi</i> estirpe ATCC 33305 / BD413 / ADP1

Para o genoma MAG2 - *Aeromonas salmonicida* AE38-XC4, o AntiSMASH identificou 5 clusters de genes: um relativo à homoserina lactona; um para biossíntese de arilpolieno; dois relativos ao cluster de peptídeo sintetase não ribossomal (NRPS) e um relativo ao produto peptídeo sintetizado ribossomalmente e modificado pós-traducionalmente (*Ripp-like*) (Tabela 14).

No *cluster RiPP-like* foram encontrados um gene biossintético central e dois genes reguladores, o gene biossintético central tem 52,60% de identidade com o gene *VP3015* / proteína UPF0276 de *Vibrio parahaemolyticus* sorotipo O3:K6 estirpe RIMD 2210633, esta proteína pertence ao grupo de família de proteínas não caracterizadas UPF0276, resultou da análise conduzida pelo InterProScan. E a análise desta mesma proteína de biossíntese central na plataforma UniProt BLAST resultou em 82,2% de identidade com a proteína contendo domínio DUF692/gene *AHA_3086* (Uniprot/Trembl: AOKMT7) de *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* ATCC 7966 e esta proteína é homóloga à superfamília tipo xilose-isomerase (InterPro: IPR036237), resultado do escaneamento de domínios proteicos conduzido pelo InterProScan.

Outros *cluster* importantes encontrados pelo AntiSMASH para MAG2 *A. salmonicida* AE38-XC4 foram o de peptídeo sintetase não ribossômica (NRPS), que representou 61% de identidade com o gene *pmsD*/*pseudomonina* sintase PmsD de *P. entomophila* estirpe L48; outro gene biossintético central com 31,5% de identidade com o gene *dhbF*/peptídeo sintase não ribossômica bimodular (uma entrada revisada no Uniprot/Swiss-prot: P45745) e um gene biossintético central *dhbF* que codifica uma enzima relacionada à biossíntese do sideróforo bacillibactina, uma classe de antibióticos sideróforos. Além disso, outro gene apresentou 33,20% de identidade com o gene *igrD* / Linear gramicidina sintase subunidade D (uma entrada revisada no Uniprot/Swiss-Prot: Q70LM4).

Tabela 14: Resultado AntiSMASH e BLAST com UniProt para o MAG2 - *Aeromonas salmonicida* AE38-XC4

AntiSMASH Cluster	Entrada/Acesso	UniProt/ BLAST		
		Proteína/Gene	Identidade	Organismo
RiPP-like	Trembl/AOKMT7	Proteína contendo o domínio DUF692/AHA_3086	82,2%	<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> ATCC 7966
	Trembl/AOKNM0	3-oxoacil-[acil-carrier-protein] sintase II/ <i>AHA_3382</i> gene	94,70%	<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> estirpe ATCC 7966
Arilpolieno	Trembl/AOKNM3	3-oxoacil-[acil-carrier-protein] sintase II / <i>AHA_3385</i> gene	84,60%	<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> estirpe ATCC 7966
NRPS	Swiss-prot/Q11AL0	pseudomonina sintase PmsD/ <i>pmsD</i> gene	61%	<i>P. entomophila</i> estirpe L48
	Swiss-prot/P45745	Peptídeo sintase não ribossômica dimodular / <i>dhbF</i> gene	31,50%	<i>Bacillus subtilis</i> estirpe 168
NRPS	Swiss-prot/Q70LM4	Gramicidina sintase linear subunidade D/ <i>lgrD</i> gene	33,20%	<i>Brevibacillus parabrevis</i>
Hserlactona	Swiss-prot/P70774	Acil-homoserina-lactona sintase/ <i>asal</i> gene	99%	<i>A. salmonicida</i>

A ferramenta OrthoVenn 2 foi capaz de encontrar 10 *hits* para a palavra-chave “Antibiótico”, sendo 8 *hits* relacionados à resistência aos antibióticos e os outros dois *hits* estavam relacionados à produção de antibióticos. Ambas as sequências, que são relacionadas à produção de antibióticos, foram encontradas nos genomas de MAG1-*Acinetobacter pittii* ACP38-XC4 e o genoma representativo *Acinetobacter pittii* PHEA-2. A proteína 4-dedimethylamino-4-oxo-anhydrotetracycline transaminase OxyQ está relacionada à biossíntese do antibiótico tetraciclina e oxitetraciclina. Já a segunda é a proteína diidroanticapsina 7-desidrogenase (BaaC) que está envolvida na biossíntese da bacilisina, o qual inativa o domínio glutaminase da glucosamina sintetase, estando presente no operon *bacABCDEFG*. Os resultados estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15: Resultado da busca por palavras-chaves na ferramenta Orthoveen 2. Os resultados foram obtidos apenas para a palavra-chave antibiótico. As linhas destacadas de cinza representam as proteínas relacionadas à produção de antibióticos.

Conjunto de Genoma	ID	Swiss-Prot ID	GO Anotação	Descrição Proteína Orthoveen	Função UNIPROT	Gene	Organismo
Todos*	cluster 213	P28246	GO:0046677; P:response to antibiotic; IEA:UniProtKB-KW	Proteína de resistência à biciclomicina	Envolvido na resistência à sulfonamida (sulfatiazol) e à biciclomicina (PubMed: 2694948); Provável translocase de membrana.	<i>bcr</i> ; <i>bicA</i> ; <i>bicR</i> ; <i>sur</i> ; <i>suxA</i>	<i>Escherichia coli</i> (K12)
<i>Acinetobacter</i> **	cluster 4717	Q3S8P9	GO:0017000; P:antibiotic biosynthetic process; IEA:UniProtKB-KW	4-dedimethylamino-4-oxo-anhydrotetracycline transaminase OxyQ {ECO:0000303 PubMed:18422316}Lay	Envolvido na biossíntese do antibiótico tetraciclina, oxitetraciclina.	<i>oxyQ</i>	<i>Streptomyces rimosus</i>
Todos	cluster 471	Q9HZ62	GO:0046677; P:response to antibiotic; IEA:UniProtKB-KW	Ácido N-acetilmurâmico 6-fosfato fosfatase {ECO:0000303 PubMed:28351916}	Catalisa especificamente a desfosforilação de N-acetilmuramato 6-fosfato (MurNAc-6P) para MurNAc (Por similaridade);	<i>mupP</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 15692)
<i>Acinetobacter</i>	cluster 4937	Q9K2Y1	GO:0046677; P:response to antibiotic; IEA:UniProtKB-KW	Proteína de membrana externa TolC	Canal externo da membrana, necessário para o funcionamento de vários sistemas de efluxo (por similaridade); Necessário para exportar citotoxina RtxA	<i>tolC</i>	<i>Vibrio cholerae</i> sorotipo O1 (ATCC 39315)
Todos	cluster 551	P0AES7	GO:0046677; P:response to antibiotic; IEA:UniProtKB-KW	DNA gyrase subunit B {ECO:0000255 HAMAP-Rule:MF_01898}	Uma topoisomerase tipo II que superenrola negativamente o DNA circular fechado de fita dupla (ds)	<i>gyrB</i>	<i>Escherichia coli</i> O157:H7
<i>Acinetobacter</i>	cluster 5138	Q9KJC1	GO:0046677; P:response to antibiotic; IEA:UniProtKB-KW	Proteína da membrana externa da bomba de efluxo de antibióticos ArpC	O componente da membrana externa de uma bomba de efluxo de antibiótico. Confere resistência a numerosos antibióticos	<i>arpC</i>	<i>Pseudomonas putida</i> (<i>Arthrobacter siderocapsulatus</i>)
Todos	cluster 769	P02918	GO:0046677; P:response to antibiotic; IDA:EcoCyc	Proteína de ligação à penicilina 1A	Formação da parede celular.	<i>mrcA</i>	<i>Escherichia coli</i> (K12)
<i>Acinetobacter</i>	cluster 5349	P39640	GO:0017000; P:antibiotic biosynthetic process; IEA:UniProtKB-KW	Diidroanticapsina 7-desidrogenase {ECO:0000303 PubMed:23317005}	Parte do operon <i>bacABCDEF</i> G responsável pela biossíntese da bacilisina.	<i>baaC</i>	<i>Bacillus subtilis</i> (168)
Todos	cluster 810	P36555	GO:0046677; P:response to antibiotic; IEA:UniProtKB-KW	Fosfoetanolamina transferase EptA	modificação da fosfoetanolamina que é necessária para resistência à polimixina	<i>eptA</i>	<i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 700720)
<i>Acinetobacter</i>	cluster 5384	P52002	GO:0046677; P:response to antibiotic; IEA:UniProtKB-KW	Proteína de resistência a múltiplas drogas MexB	O componente transportador de membrana interna do sistema de efluxo MexAB-OprM que confere resistência a múltiplas drogas.	<i>mexB</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 15692)

* Todos = MAG1- *Acinetobacter pittii* ACP38-XC4; MAG2- *Aeromonas salmonicida* AE38-XC4; *Aeromonas salmonicida* SRW-OG e *Acinetobacter pittii* PHEA-2.

* *Acinetobacter*= MAG1- *Acinetobacter pittii* ACP38-XC4 e o genoma representativo *Acinetobacter pittii* PHEA-2.

A análise de atribuição de ortologia e o mapeamento das vias metabólicas realizadas pelas ferramentas KEGG *Automatic Annotation Server* (KAAS) (Moriya *et al.*, 2007) e KEGG *Mapper Reconstruction* (Kanehisa & Sato, 2020) resultaram em: para MAG1- *A. pittii* ACP38-XC4 seis categorias de grupos funcionais, sendo 40 subcategorias com o total de 3.288 genes ortólogos; e para MAG2- *A. salmonicida* AE38-XC4 seis categorias de grupos funcionais, sendo 42 subcategorias com o total de 3.835 genes (Figura 24 e 25).

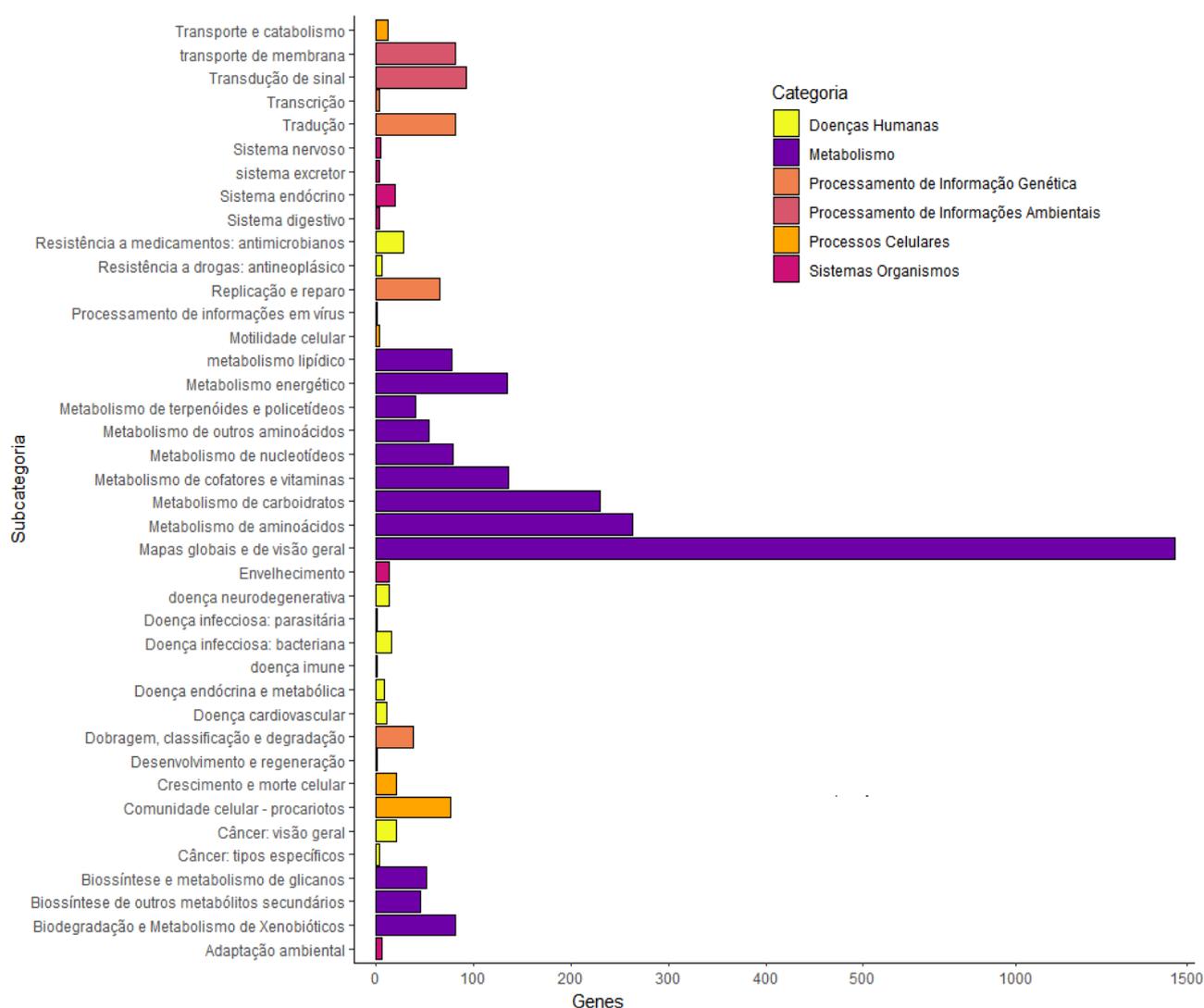


Figura 24: A anotação funcional de grupos ortólogos com as ferramentas KAAS e KEGG Mapper Reconstruction do MAG1- *A. pittii* ACP38-XC4.

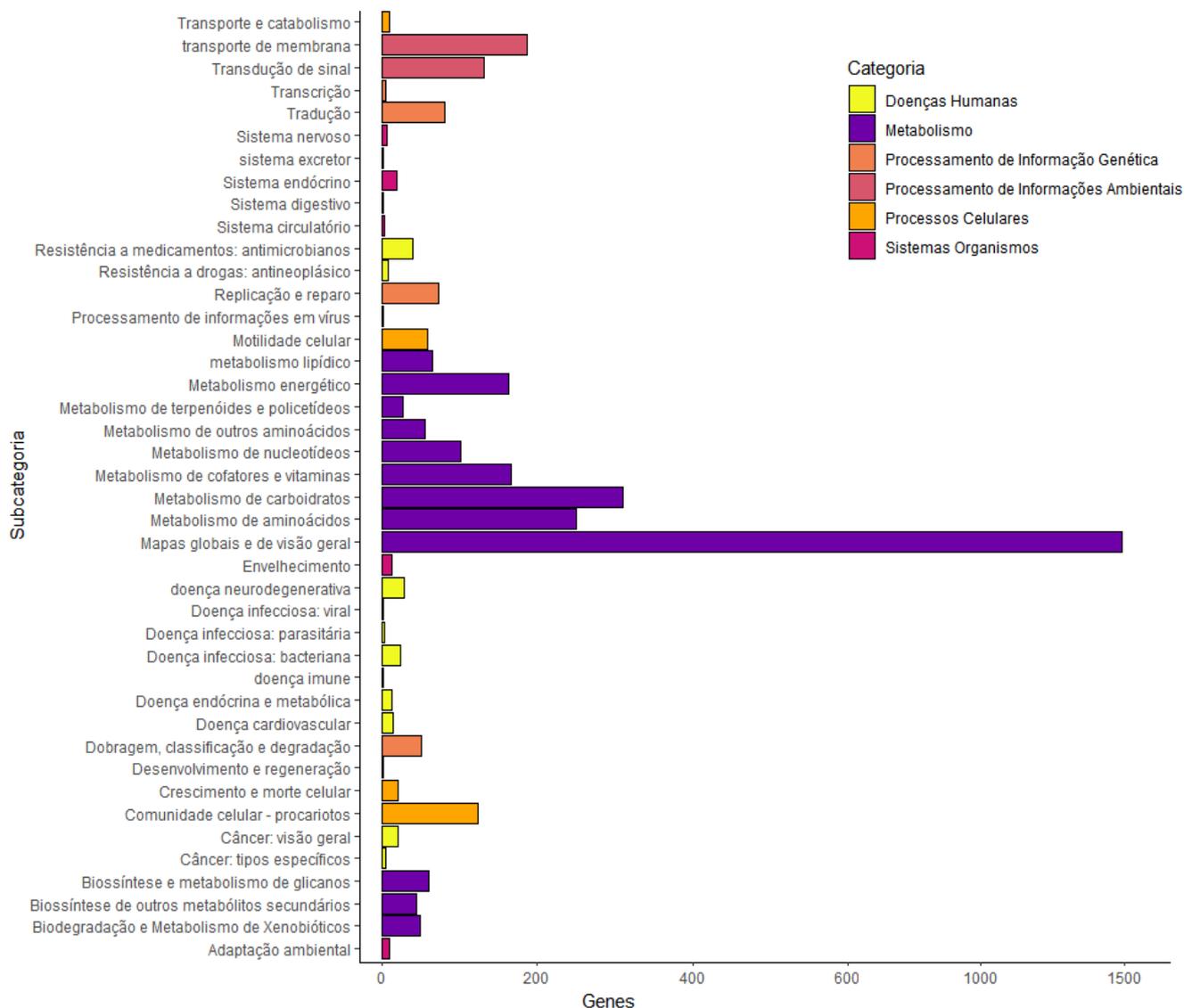


Figura 25: A anotação funcional de grupos ortólogos com as ferramentas KAAS e KEGG Mapper Reconstruction do MAG2- *A. salmonicida* AE38-XC4.

Em relação a produção de substâncias antimicrobianas, algumas categorias foram analisadas, para MAG1- *A. pittii* ACP38-XC4, a categoria “Metabolismo” possui 12 subcategorias com 2.652 genes, sendo as principais: “Biossíntese de metabólitos secundários” com 253 genes; “Metabolismo de terpenóides e policetídeos” com 46 genes e “Biossíntese de outros metabólitos secundários” com 46 genes. A subcategoria “Biossíntese de outros metabólitos secundários” foi analisada e dentro desta temos uma via “00998 Biossíntese de vários antibióticos”, tais como: kanosamina, auraquina, bacilisina, puromicina, dapdiamidas, fosfomicina, cremeomicina, pentalenolactona, terpentecina, roseoflavina, cicloserina que contém 3 ortólogos (K02078/01070;

K21721/01999 e K21949/01998). Dentre esses três genes, vale ressaltar o gene *sbnB* que é um precursor da estafiloferrina B e antibióticos, e o gene *sbnA* que codifica uma proteína de biossíntese de estafiloferrina B (SbnA), que é um sideróforo. Já para MAG2- *A. salmonicida* AE38-XC4, a categoria “Metabolismo” possui 12 subcategorias com 2.879 genes. Sendo as principais: “Biossíntese de metabólitos secundários” com 288 genes; “Metabolismo de terpenóides e policetídeos” com 27 genes e “Biossíntese de outros metabólitos secundários” com 44 genes.

Outra análise para buscar substâncias antimicrobianas, como as bacteriocinas, foi realizada por meio da ferramenta BLASTp com os bancos de dados BAGEL (classe III), BACTIBASE e Genes de bacteriocinas para a produção de zoocina e colicina V. Como resultado, foram encontradas três sequências para MAG1- *Acinetobacter pittii* ACP38-XC4 com 36.29%, 35.65% e 35.21% de identidade com a sequência proteica de produção de Zoocina A (Uniprot: O54308 STRSZ). Esses resultados estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16: Análise das sequências identificadas pelo BLASTp no banco de dados BAGEL classe III para MAG1- *Acinetobacter pittii* ACP38-XC4.

BLASTp (Zoocin_A_UNIPROT_O54308_STRSZ) X MAG1 - <i>Acinetobacter pittii</i> ACP38-XC4											InterPro		
Sequência PROKKA	Identidade	Tamanho Alinhamento	<i>mism</i>		q. start	q. end	s. start	s. end	evalue	bit score	Domínio	ID	Posição
			atches	gaps									
MLGADDLH_01381	35.211	142	70	5	104	230	27	161	3.05e-16	68.2	Peptidase_M23	IPR016047	176 - 269
											LysM_dom	IPR018392	53 - 98
MLGADDLH_02352	36.290	124	62	3	162	270	39	160	1.39e-16	69.7	Peptidase_M23	IPR016047	169 - 263
											Peptidase family M23 N-terminal domain	IPR040487	32 - 85
MLGADDLH_02957	35.652	115	63	3	162	269	31	141	2.31e-11	54.7	Peptidase_M23	IPR016047	128 - 222

E para MAG2- *Aeromonas salmonicida* AE38-XC4 foram encontradas quatro sequências com 50%, 45.65%, 43% e 35.96% de identidade também com a sequência proteica de produção de zoocina A (Uniprot: O54308 STRSZ), resultados apresentados na Tabela 17. Essas proteínas encontradas em ambos os genomas têm semelhança com a proteína de produção da zoocina A, uma bacteriocina com ação D-alanil-L-alanina endopeptidase. Todas as sequências encontradas pelo BLASTp foram analisadas pela

ferramenta InterProScan para verificar os domínios presentes nelas e os alinhamentos estão apresentados nas Figuras 26 e 27.

Tabela 17: Análise das sequências oriundas do BLASTp contra o banco de dados BAGEL Classe III para o MAG2- *Aeromonas salmonicida* AE38-XC4.

Sequência PROKKA	BLASTp (Zoocin_A_UNIPROT_O54308_STRSZ) para o MAG2- <i>Aeromonas salmonicida</i> AE38-XC4											InterPro	
	Identidade	Tamanho Alinhamento	mismatches	gap opens	q. star t	q. end	s. start	s. end	evaluate	bit score	Domínio	ID	Posição
DHMOPFJE_03496	50.000	94	38	2	297	382	45	137	4.62e-20	82.0	Peptidase_M23	IPR016047	296 - 389
											Csd3_N2	IPR045834	165 - 284
											Opacity-associated protein A LysM-like domain	PF04225	77 - 136
											Opacity-associated protein A N-terminal motif	PF08525	7 - 33
DHMOPFJE_02144	43.000	100	49	3	192	284	39	137	1.17e-16	70.5	Peptidase_M23	IPR016047	198 - 292
DHMOPFJE_02877	35.965	114	56	3	172	269	45	157	7.43e-18	73.6	Peptidase family M23	PF01551	171 - 265
											Peptidase family M23 N-terminal domain	PF18421	27 - 97
DHMOPFJE_00457	45.652	92	43	2	319	403	45	136	3.60e-18	76.3	Peptidase_M23	IPR016047	318 - 411
											Csd3 second domain	PF19425	183 - 306
											LysM domain profile.	PS51782	98 - 145
											Opacity-associated protein A LysM-like domain	PF04225	96 - 175

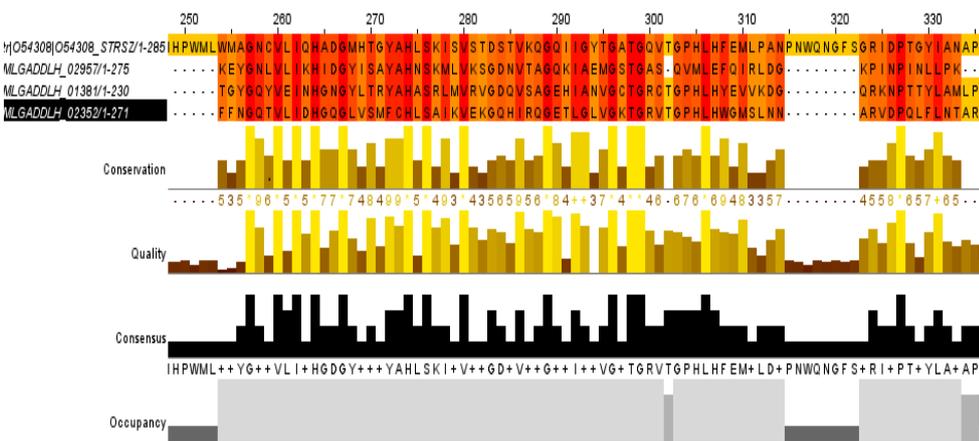
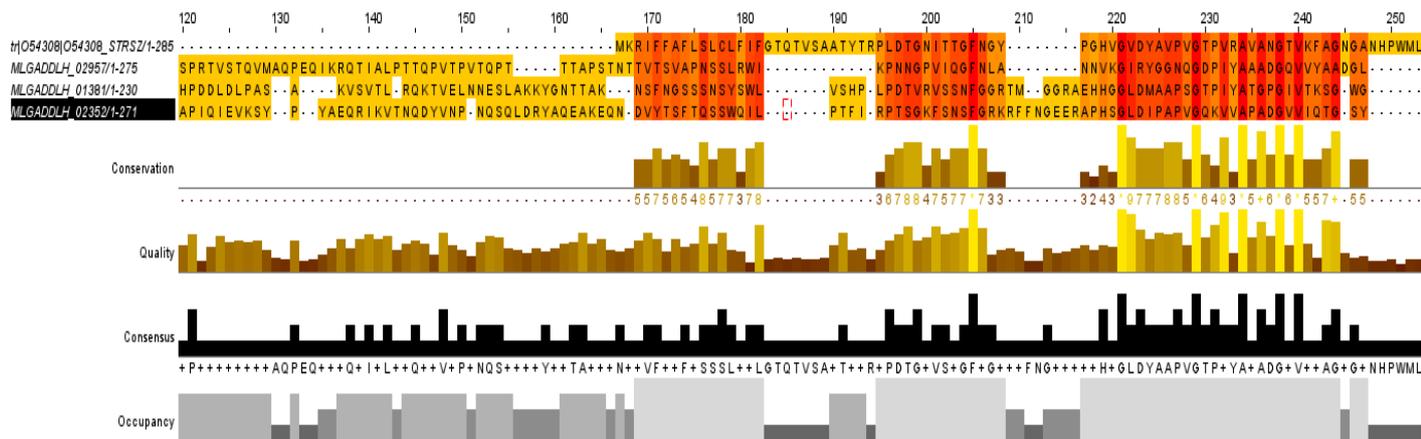


Figura 26: Alinhamento Múltiplo entre a proteína zoocina A, uma peptidase, da família M23/M37 de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (Número de acesso do UniProtKB/SwissProt: O54308) e três sequências do MAG1- *Acinetobacter pittii* ACP38-XC4, oriundas do resultado da análise do BLAST. As posições 218–311 aa mostram a região do domínio da peptidase M23. O alinhamento múltiplo foi colorido por esquema de conservação; as regiões com propriedades físico-químicas mais conservadas são coloridas em laranja (cor mais escura) e os locais menos conservados são coloridos em amarelo (cor mais clara).

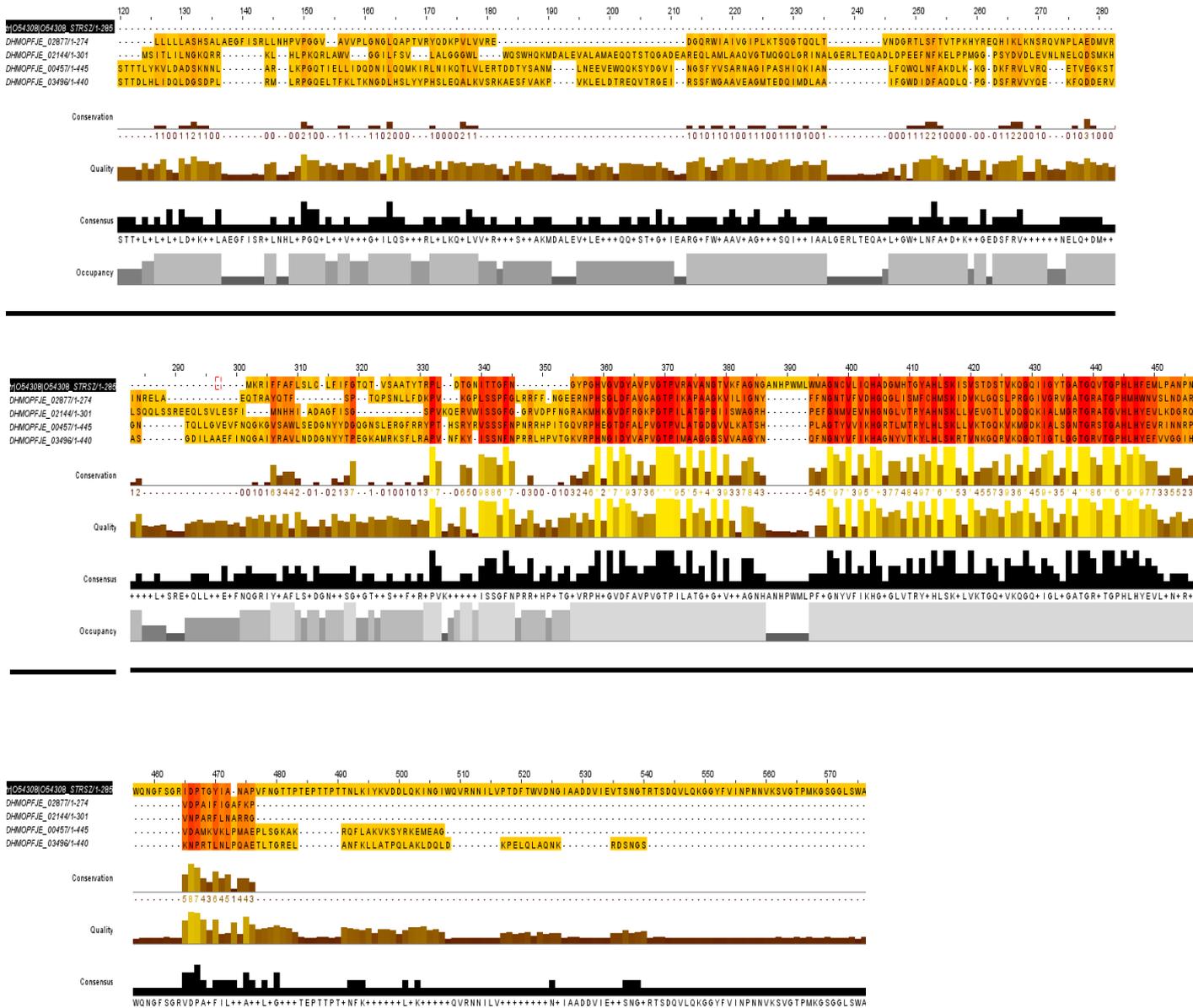


Figura 27: Alinhamento Múltiplo entre a proteína zocina A, uma peptidase, da família M23/M37 de *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus* (Número de acesso do UniProtKB/SwissProt: O54308) e quatro seqüências do MAG2- *Aeromonas salmonicida* AE38-XC4, oriundas do resultado da análise do BLAST. As posições 259–452 aa mostram a região do domínio da peptidase M23. O alinhamento múltiplo foi colorido por esquema de conservação; as regiões com propriedades físico-químicas mais conservadas são coloridas em laranja (cor mais escura) e os locais menos conservados são coloridos em amarelo (cor mais clara).

3.4 - Discussão

A cultura mista 38-XC4, foi testada para a produção de substâncias antimicrobianas e apresentou um espectro de ação estreito, podendo inibir dois importantes gêneros bacterianos patogênicos, *Klebsiella* e *Staphylococcus*. Devido isso, foi selecionada para ter o seu genoma sequenciado. Ao realizar o sequenciamento, pode-se ver que a estirpe que foi originalmente designada como um isolado de *Aeromonas salmonicida* AE38, na verdade era uma cultura mista, contendo o genoma de duas bactérias de gêneros distintos. Sendo assim, a forma como os dados dessa cultura mista foram processados difere da metodologia descrita no capítulo 2 para a estirpe pura *Aeromonas allosaccharophila* AE59-TE2. Uma abordagem possível para realizar a separação *in silico* do genoma das duas bactérias é a técnica *Metagenome Assembled Genome* (MAG), que é utilizada para montar genomas por meio de amostras de metagenomas. MAG é um genoma pertencente a um táxon único que resulta de dados metagenômicos. Essa técnica utiliza as diferentes características genômicas, como o conteúdo G+C, cobertura de sequenciamento e diferenças entre bases para separar e montar genomas de culturas mistas (Breitwieser *et al.*, 2019).

Os genomas contidos na cultura mista foram separados com a ferramenta MetaBAT2, esta afirmação pode ser comprovada pela comparação dos resultados apresentados na Tabela 10 e as métricas dos genomas representativos de cada espécie, sendo: *Acinetobacter pittii* PHEA-2 com o tamanho total de 3.86 Mb em um *scaffold* e *Aeromonas salmonicida* SRW-OG1, com um *scaffold* e o comprimento total de 4.62 Mb. Assim como no trabalho de Ateba e colaboradores (2020) que coletou duas amostras de metagenomas oriundos de cães para realizar a abordagem de montagem de genomas por metagenômica, com a técnica *Metagenome Assembled Genome* (MAG), que conseguiu isolar dois genomas dentro do metagenoma nomeado de D84, com 10.293.073 pb em 575 *contigs*. Os genomas foram separados, montados e identificados como pertencentes aos gêneros: *Pseudomonas* sp. estirpe NID84 e *Acinetobacter* sp. estirpe N2D84. Mostrando assim, que a técnica é capaz de separar genomas e já é aplicada nas pesquisas, como relatada na literatura. Além dessa análise, a comparação realizada pela ferramenta OrthoVenn 2, que apresenta o número de *clusters* contidos em cada genoma, mostra que os genomas montados apresentam uma quantidade de clusters semelhantes com os representativos, mostrando a eficiência da técnica *Metagenome Assembled Genome* (MAG) em separar os genomas da cultura mista. Outro indício importante foi a análise

da categoria de “Motilidade celular” anotado através da ferramenta KEGG e KAAS, pois anotou menos genes para o gênero *Acinetobacter* e isso ocorre devido as estirpes do gênero *Acinetobacter* serem imóveis, tendo motilidade apenas pela contração, uma característica do pilus na membrana celular (Bunnoy *et al.*, 2019).

Após separar os genomas foi realizada a identificação taxonômica dos MAGs. As bactérias do gênero *Acinetobacter* formam um grupo heterogêneo, que já sofreu diversas modificações taxonômicas, sendo considerado um gênero de difícil classificação à nível de espécie (Vijayakumar, Biswas & Veerarahavan, 2019). Assim como, o gênero *Aeromonas* que também precisa de análises mais precisas para a identificação à nível de espécie, já que as sequências dos genes que codificam o rRNA 16S são muito conservadas e não possuem sinais genéticos para distinguir algumas espécies do gênero (Janda & Abbott, 2010). Após esta análise preliminar à nível de gênero, foram realizadas diversas outras abordagens para identificá-los à nível de espécie, como: ANI e MLSA. Sendo possível verificar que ambas as análises identificaram MAG1 como sendo pertencente a espécie *Acinetobacter pittii* e MAG2 como *Aeromonas salmonicida*, mostrando que ambas as técnicas foram capazes de classificar os MAGs à nível de espécie.

Bactérias do gênero *Aeromonas* e *Acinetobacter* são encontradas em diversos ambientes, podendo colonizar animais, como no artigo de Bunnoy e colaboradores (2019), que relata a presença do gênero *Acinetobacter* na pele de peixes de nome popular: “bagres cabeçudos” (*Clarias macrocephalus*). O gênero *Aeromonas* também já foi isolado de animais marinhos, como no trabalho de Wu e colaboradores (2019) que isolou 128 bactérias de peixes e 47 bactérias clínicas, as principais espécies encontradas foram: *Aeromonas caviae*, *A. dhakensis* e *A. veronii*. Mostrando que o gênero está difundido em vários ambientes. Assim como os trabalhos mencionados, esta tese também comprova a presença dos gêneros *Aeromonas* e *Acinetobacter* em amostras oriundas de peixes. Sendo que, ambos os gêneros são considerados oportunistas, podendo causar doenças em humanos e outros animais, como os marinhos. Buscar genes relacionados à resistência aos antibióticos também é fundamental devido ao histórico de ambos os gêneros. Através das ferramentas PATRIC e OrthoVenn 2 foi possível encontrar genes relacionados à resistência antimicrobiana, como os genes *mupP* (resistência intrínseca à fosfomicina), *arpC* (bomba de efluxo de antibióticos) e *eptA* (resistência à polimixina). Mostrando que ambos possuem genes relacionados à resistência à antibióticos. Buscar produtos do

metabolismo com atividade microbiana também é importante, pois as bactérias naturalmente possuem diversos mecanismos de defesa contra outras bactérias. Uma dessas defesas é a produção de substâncias antimicrobianas, que possuem a capacidade de inibir ou até matar microrganismos.

A multirresistência é um dos problemas de saúde mais preocupantes na sociedade moderna. Vários artigos científicos relatam um número crescente de microrganismos apresentando resistência a vários antibióticos disponíveis (Mühlberg *et al.*, 2020; Dahal *et al.*, 2020). Alguns gêneros de bactérias já são conhecidos por possuírem enzimas que propiciam a resistência desses organismos frente aos antibióticos. Como o gênero *Klebsiella*, que pode causar diversas infecções, sendo um patógeno humano conhecido como uma ameaça crescente à saúde pública. Algumas estirpes do gênero *Klebsiella* são capazes de produzir a enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) e assim, apresentam grande resistência aos antimicrobianos conhecidos (Effah *et al.*, 2020; Aires *et al.*, 2020). O gênero *Staphylococcus* apresenta resistência a múltiplas drogas (Nicolae Dopcea *et al.*, 2020). Estirpes de *Staphylococcus aureus* podem ser resistentes à meticilina (MRSA, do inglês *Multiple-resistant Staphylococcus aureus*) (Thai Son *et al.*, 2020). Essas estirpes são de grande preocupação por estarem presentes tanto em hospitais quanto no meio ambiente (Oladipo, Oladipo & Bezuidenhout, 2019). A busca por novas substâncias antimicrobianas é de suma importância para fazer o controle desses patógenos multirresistentes. Neste trabalho, visa-se buscar estirpes bacterianas que possam produzir substâncias antimicrobianas capazes de combater essas bactérias patogênicas multirresistentes. No capítulo 2 e 3, diversas estirpes do gênero *Aeromonas* foram capazes de inibir estirpes patogênicas. Sendo no capítulo 3 descrita a cultura mista 38-XC4, que é capaz de inibir importantes gêneros multirresistentes, como os gêneros *Klebsiella* e *Staphylococcus*, mostrando sua importância biotecnológica frente a esse problema de saúde pública.

Dentre as 57 amostras testadas, 38 estirpes foram positivas para o teste de antagonismo, sendo capazes de inibir alguma das estirpes patogênicas utilizadas. A cultura mista 38-XC4 e mais três estirpes (AE32, AE35 e AE44) possuem um perfil semelhante. A cultura mista 38-XC4 apresenta um espectro de ação específico, podendo inibir os gêneros *Klebsiella* e *Staphylococcus*. Na literatura há relatos de estirpes do gênero *Aeromonas*, descritos como produtoras de bacteriocinas (Moro *et al.*, 1997;

Gibson, Woodworth & George, 1998; Bondi *et al.*, 2000; Messi *et al.*, 2003; Lategan *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2008). Tang e colaboradores (2020) anotaram um *cluster* de bacteriocina no genoma da estirpe *Aeromonas caviae* SCAC2001, isolada de pacientes com doença diarreica. Estirpes do gênero *Acinetobacter* também demonstraram a capacidade de produzir substâncias antimicrobianas. *Acinetobacter baumannii* JE6 produz uma bacteriocina com atividade sobre microrganismos patogênicos, nomeadamente *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo *Typhi* ATCC 19214, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* e *Bacillus cereus* (Conceição *et al.*, 2018). No trabalho de Bunnoy e colaboradores (2019), os autores afirmam que apesar do gênero *Acinetobacter* estar associado a patogenicidade humana e de animais aquáticos, há a necessidade de fazer a caracterização de exemplares ambientais, para verificar os potenciais benéficos ao meio ambiente. Com isso, foi realizada a caracterização da bactéria *Acinetobacter* estirpe KU011TH, isolada do muco da pele de peixes de nome popular: “bagres cabeçudos” (*Clarias macrocephalus*), que apresentou atividade antagônica contra diversos patógenos de peixes. O estudo foi realizado com o objetivo de desenvolver um novo probiótico.

Os gêneros *Aeromonas* e *Acinetobacter* são importantes produtores de substâncias antimicrobiana com potencial biotecnológico, sendo uma prática comum o sequenciamento de genomas bacterianos para descobrir novas substâncias promissoras. As tecnologias de sequenciamento do genoma reduziram o tempo gasto em métodos tradicionais de bioprospecção, permitindo, por exemplo, que os cientistas façam uma triagem massiva de novas substâncias putativas (Egan *et al.*, 2018). Esta tese caracterizou os genomas separados pela técnica *Metagenome Assembled Genome* (MAG), para buscar genes relacionados à produção de substâncias antimicrobianas. Por meio do uso da ferramenta AntiSMASH, para o MAG1 foi possível anotar o gene *dhbF* que codifica uma substância descrita como pertencente a classe bacilibactina de antibióticos sideróforo, que tem a capacidade de inibir patógenos resistentes a drogas, como *S. aureus* resistente à meticilina, *E. faecalis* resistente à vancomicina, *P. aeruginosa* e *K pneumoniae* (Chakraborty *et al.*, 2022). O sideróforo catecolato bacilibactina da bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* MBI60 pode inibir *P. syringae* pv. em tomate e outros fitopatógenos bacterianos e fúngicos não susceptíveis a outras drogas (Dimopoulou *et al.*, 2021). Os genes *dhbA* e *dhbF* foram encontrados na cepa *Acinetobacter pittii* ACP38-XC4 e esta cultura mista 38-XC4 foi capaz de inibir as bactérias *S. aureus* e *K. pneumoniae*.

Além disso, em MAG2- *Aeromonas salmonicida* AE38-XC4 foi identificado o gene *pmsD/pseudomonina* sintase e este gene está envolvido na biossíntese do sideróforo pseudomonina. Os sideróforos são compostos orgânicos com a capacidade de absorção de ferro, transportando esse metal importante para o crescimento das bactérias (Schalk, 2018). Um dos problemas dos antibióticos é a capacidade de eles atravessarem a parede celular de bactérias Gram-negativas. Para solucionar esse problema são utilizadas as vias de sideróforos que atuam como transportadores de nutrientes. Os antibióticos ligam-se covalentemente aos sideróforos formando um híbrido sideróforo-antibiótico, que através do sistema de transporte de captação de ferri-sideróforos conseguem entrar na célula, contornando o problema de impermeabilidade da parede celular (Schalk, 2018). A acinetobactina e a pseudomonina são quase isômeros (Sattely e Walsh, 2008). A acinetobactina é um sideróforo que possui três grupos funcionais quelantes: o catecol, a oxazolina/tiazolina e o hidroxamato (Wuest, Sattely & Walsh, 2009). Também relatado por ser fator de virulência das bactérias que as possibilitam infectar e matar o hospedeiro vertebrado (Gaddy *et al.*, 2012). Além desses genes, também foi anotado o *igrD*/Linear gramicidina sintase subunidade D. A gramicidina linear é um antibiótico pentadecapeptídeo e são necessários quatro ORFs (quadros de leitura aberta) para codificá-los, *lgrA*, *lgrB*, *lgrC* e *lgrD* (Kessler *et al.*, 2003). Os genes *lgrB* e *lgrD* foram anotados pela ferramenta PROKKA no MAG2- *Aeromonas salmonicida* AE38-XC4.

A busca por proteínas relacionadas com a atividade antimicrobiana, também foi realizada pela plataforma BLASTP. Podendo verificar que tanto para MAG1 - *Acinetobacter pittii* ACP38-XC4, como para MAG2- *Aeromonas salmonicida* AE38-XC4 foram encontrados genes relacionados a produção de zoocina A, que é uma bacteriocina descrita em bactérias da espécie *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, esta bacteriocina pode clivar o peptidoglicano de bactérias (Gargis *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2013). Ao analisar as sequências no InterPro para verificar o domínio das proteínas, foi possível encontrar o domínio peptidase M23 que é característico da Zoocina A. Esses resultados mostram que ambos os MAGs possuem genes relacionados à produção de bacteriocinas, sendo semelhantes à zoocina A.

Ao analisar essa cultura mista oriunda de peixes, pode-se verificar que o estudo metagenômico foi importante para separar os genomas *in silico* e avaliar os genes funcionais, principalmente realizar a busca de genes relacionados a produção de

substâncias antimicrobianas, como as bacteriocinas. Podendo comparar esses resultados, com os resultados obtidos nos testes de antagonismos realizados na bancada. Mostrando que a interação desses dois microrganismos é benéfica, e que a cultura mista é capaz de inibir o crescimento de bactérias patogênicas, de interesse clínico.

3.5 – Conclusão

Por meio dos estudos apresentados neste capítulo, foi possível concluir que a metodologia aplicada para a montagem dos metagenomas da cultura mista 38-XC4 possibilitou reconstruir genomas com alta qualidade, os quais foram identificados como MAG1 *Aeromonas salmonicida* AE38-XC4 e MAG2 *Acinetobacter pittii* ACP38-XC4. A busca por genes e proteínas relacionadas a produção de substâncias antimicrobianas foi possível pela análise de conteúdo gênico para ambos os genomas, possibilitando a identificação de genes envolvidos com a síntese de substâncias, como zoocina A, que podem ser usadas contra bactérias multirresistentes como *S. aureus* e *K. pneumoniae*. Além disso, outras moléculas de interesse farmacêutico para controle de bactérias patogênicas foram encontradas, como bacillibactina (antibióticos sideróforos), aerobactina, gramicidina linear, sideróforo pseudomonina e proteínas não caracterizadas. O sideróforo foi descrito como importante para uso com antibióticos contra bactérias Gram-negativas, e alguns sideróforos têm atividade contra bactérias. Assim, os resultados de nosso estudo podem ser utilizados como fonte para possíveis moléculas para combate de bactérias multirresistentes, com isso a cultura mista tem grande aplicação biotecnológica.

Capítulo 4

*Bioprospecção de bacteriocinas em amostras de água e de peixes da espécie *Serrasalmus rhombeus* (nome popular: piranha preta) do Rio São Benedito, Pará.*

CAPÍTULO 4

Bioprospecção de bacteriocinas em amostras de água e de peixes da espécie *Serrasalmus rhombeus* (nome popular: piranha preta) do Rio São Benedito, Pará.

4.1 - Introdução

Por meio dos estudos realizados nos capítulos 2 e 3 desta tese, pode-se levantar a hipótese de que o ambiente aquático e os peixes são importantes habitats de bactérias com a capacidade de produzir substâncias antimicrobianas, como as bacteriocinas. Assim, por meio dos peixes foi possível isolar uma coleção de estirpes do gênero *Aeromonas* com grande capacidade antagônica contra diversas estirpes patogênicas. Neste capítulo foi investigado a hipótese de que os peixes são capazes de concentrar grupos de bactérias que podem ser fontes de novas bacteriocinas.

Então para isso, foi realizada a bioprospecção de bacteriocinas *in silico* em quatro metagenomas de água do Rio São Benedito, localizado no estado do Pará. Já para testar a hipótese de peixes como fonte de bactérias com genes de interesse, foram selecionadas quatro espécies. Foram coletados cinco indivíduos dos peixes: *Serrasalmus rhombeus* (nome popular: piranha preta), *Cichla mirinae* (nome popular: tucunaré de Fogo) e três indivíduos das espécies *Zungaro zungaro* (nome popular: jaú) e *Hydrolycus scomberoides* (nome popular: cachorra). O número de réplicas foi alterado devido às condições do dia da pesca e logo após as coletas das amostras, todos os peixes foram devolvidos à natureza. Devido à grande quantidade de amostras, neste estudo, o peixe *Serrasalmus rhombeus* foi selecionado para ser estudado primeiro, e os resultados estão apresentados neste capítulo. Esta espécie foi selecionada devido a sua capacidade itinerante no rio, seu hábito alimentar, já que é predadora, e também pela importância na literatura, pois é uma espécie de peixe bastante conhecida. As amostras das outras espécies encontram-se armazenadas em 1000 µl de água peptonada alcalina (APA) e glicerol 20% a -80°C e serão analisadas em trabalhos futuros do laboratório. A água peptonada alcalina foi selecionada, pois é um meio de enriquecimento para o gênero *Aeromonas*, qual já apresentou um grande número de estirpes produtoras de bacteriocinas nos capítulos anteriores.

Dentre os cinco indivíduos do peixe da espécie *S. rhombeus*, foram coletadas uma amostra de cada ponto para cada indivíduo: (A) boca, (B) brânquias e (C) ânus. Para realizar a bioprospecção de substâncias antimicrobianas na bancada, foram utilizadas as bactérias isoladas dos três grupos (boca, brânquias e ânus). Já para realizar a bioprospecção *in silico* por meio das análises metagenômicas, apenas o grupo das amostras oriundas do ânus foi selecionado.

Para responder todas as hipóteses levantadas acima e atingir os objetivos desta tese, foi necessário dividir este capítulo em duas partes: I- análises *in vitro*, através do isolamento e testes realizados na bancada e II- análises *in silico*, por meio da metagenômica.

4.2 – Material e Métodos

As figuras 28 e 29 apresentam a metodologia do capítulo 4, o qual analisa os 5 metagenomas oriundos do peixe *S. rhombeus* e 4 metagenomas da água do Rio São Benedito. A metodologia para este capítulo foi dividida em duas partes.

Para a parte I- análises de bancada (Figura 28), as seguintes metodologias foram empregadas:

- 1- Coleta dos peixes e das amostras
- 2- Isolamento e identificação preliminar das bactérias de todas as amostras das três regiões (boca, brânquias e ânus) dos cinco indivíduos do peixe *S. rhombeus*. Para esta etapa, as bactérias foram inoculadas em caldo nutriente e após, foram realizados esgotamentos em placa contendo meio ágar nutriente para a obtenção de colônias isoladas. Para a identificação, a técnica de espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz por tempo de voo (MALDI-TOF) foi selecionada, mesmo sendo mais indicada para estirpes clínicas, pois é um método rápido e mais acessível para termos uma identificação de gênero, visto que não foi possível realizar uma identificação mais precisa, com o uso do sequenciamento do gene que codifica o rRNA 16S.
- 3- Detecção da produção de substâncias antimicrobianas por testes de antagonismos.

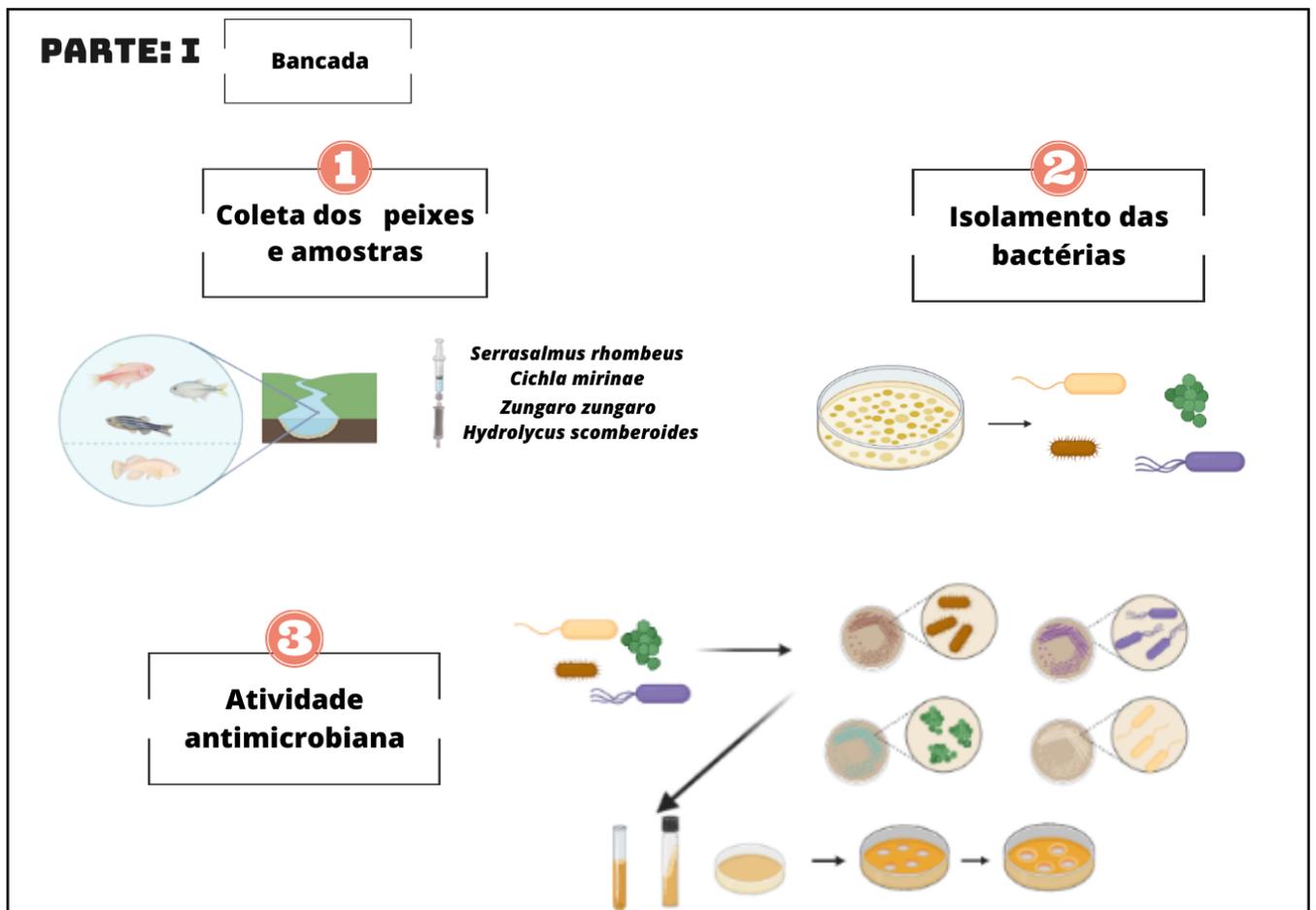


Figura 28: Representação do material e métodos utilizados neste capítulo 4 (Parte I).
Figura feita com a ferramenta BioRender e Canvas.

A parte II está apresentada na Figura 29, a qual está relacionada com análises de bioinformática dos metagenomas, sendo as seguintes metodologias empregadas:

1. Extração e sequenciamento *shotgun* dos metagenomas oriundos dos quatro pontos da água e cinco oriundos da região (C) ânus dos peixes *S. rhombeus*. O método de sequenciamento utilizado foi o do Illumina pelo equipamento Miseq (LagBio, Paraná-Brasil).
2. Processamento dos dados e montagem dos metagenomas. Os dados foram filtrados com a ferramenta Trimmomatic v0.39 e então usados par a montagem dos metagenomas com a ferramenta MetaSPAdes v3.15.0. Os *bins* foram gerados com a ferramenta MaxBin v2.2.4. Apesar de ter sido possível gerar dois *bins* para cada metagenoma, os *bins* estavam com baixa completude, sendo assim, iríamos perder uma grande quantidade de dados. Devido a essa

questão, apenas a montagem do MetaSPAdes foi utilizada para as demais etapas do projeto.

3. Avaliação da biodiversidade bacteriana. Para gerar o perfil taxonômico foi utilizada a ferramenta MG-RAST v. 4.0.3 (banco de dados RefSeq) e a linguagem de programação R com o pacote Phyloseq, além de acessar a alfa e beta diversidade. Por meio dessa etapa foi possível verificar se há a presença de gêneros de interesse, como o gênero *Aeromonas*, relatado nos capítulos 2 e 3 como grande produtor de substâncias antimicrobianas.
4. Anotação e avaliação funcional. Para essa etapa as ferramentas KEGG *Automatic Annotation Server* (KAAS) + KEGG *Mapper Reconstruction e Rapid Prokaryotic Genome Annotation* (PROKKA) v 1.12 foram utilizadas. Os plasmídeos foram analisados com a ferramenta *PlasmidFinder* 2.1 e o perfil de virulência foi avaliado com a ferramenta *Mass screening of contigs for antimicrobial resistance or virulence genes* (ABRICate) v 1.0.1 utilizando todos os bancos de dados disponíveis.
5. Busca de genes relacionados à produção de substâncias antimicrobianas. A ferramenta *Antibiotics and Secondary Metabolite Analysis Shell* (AntiSMASH) v6.0.1 foi utilizada para a busca de bacteriocinas e metabólitos secundários. A ferramenta BLASTp v.2.11.0+ foi utilizada para a busca de proteínas contra os bancos de dados: *Bacteriocin Genome Mining tool* (BAGEL) classe I, II e III; BACTIBASE e proteínas de produção de Zoocina A e Colicina V oriundas do servidor UniProt. Por meio dessa etapa foi possível verificar a hipótese de que bactérias oriundas de peixes e ambiente aquático são promissoras para a bioprospecção de genes associados com a atividade antimicrobiana.

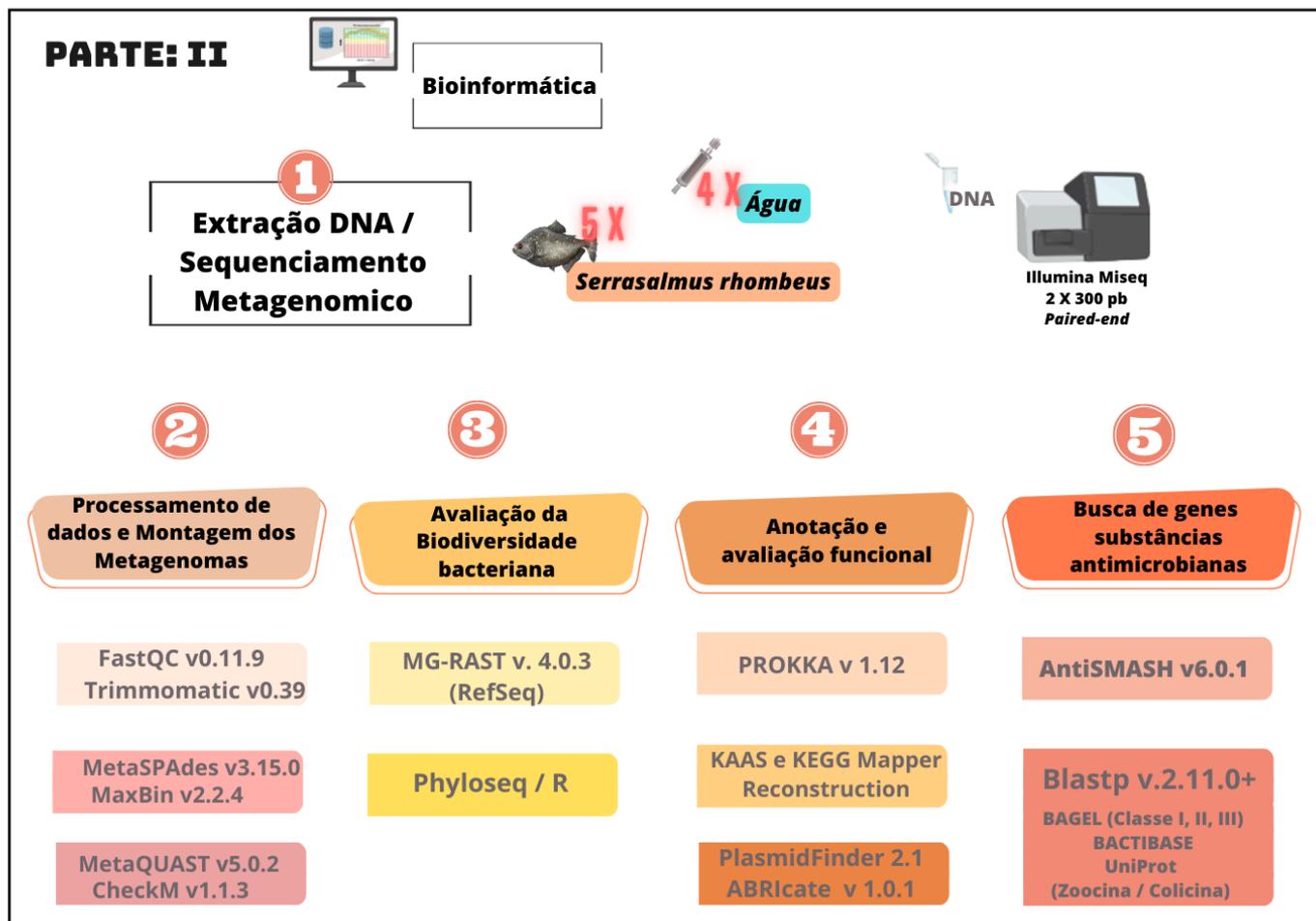


Figura 29: Representação de material e métodos utilizados no capítulo 4 (Parte II). Figura feita com a ferramenta BioRender e Canvas.

4.2.1 Parte I: testes *in vitro*

4.2.1.1- Coleta das amostras

4.2.1.1.1 Local de coleta

Para realizar essa etapa do trabalho, o Rio São Benedito, localizado no estado do Pará, Brasil (Figura 30), foi selecionado, devido ser uma área com baixo impacto humano e de preservação ambiental. O Rio São Benedito é um afluente do Rio Teles Pires, possui um bioma de transição entre a Floresta Amazônica e o Cerrado, sendo uma área com uma grande diversidade biológica (Pará Turismo, 2018). Existem diversas espécies de peixes presentes, dos quais foram selecionados alguns para a busca de bactérias e coleta de amostras para a realização do sequenciamento metagenômico.



Figura 30: Foto da pousada Thaimacu na beira do Rio São Benedito, PA-Brasil. Fonte: arquivo pessoal do Dr. Andrew Macrae.

4.2.1.1.2 Seleção dos peixes e coleta das amostras dos peixes

Todas as coletas foram realizadas pelo professor Dr. Andrew Macrae, professor titular da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Brasil, e o pelo Dr. Andrew S. Whiteley da *Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO)*, Austrália. A coleta foi realizada no Rio São Benedito no município de Jacareacanga no estado do Pará, localizado no Brasil, nos dias 16 e 17 do mês de junho do ano de 2018. Os pontos de coleta foram marcados no mapa apresentado na Figura 31. Em alguns pontos, foi realizada a coleta da amostra de água, como também a do peixe.

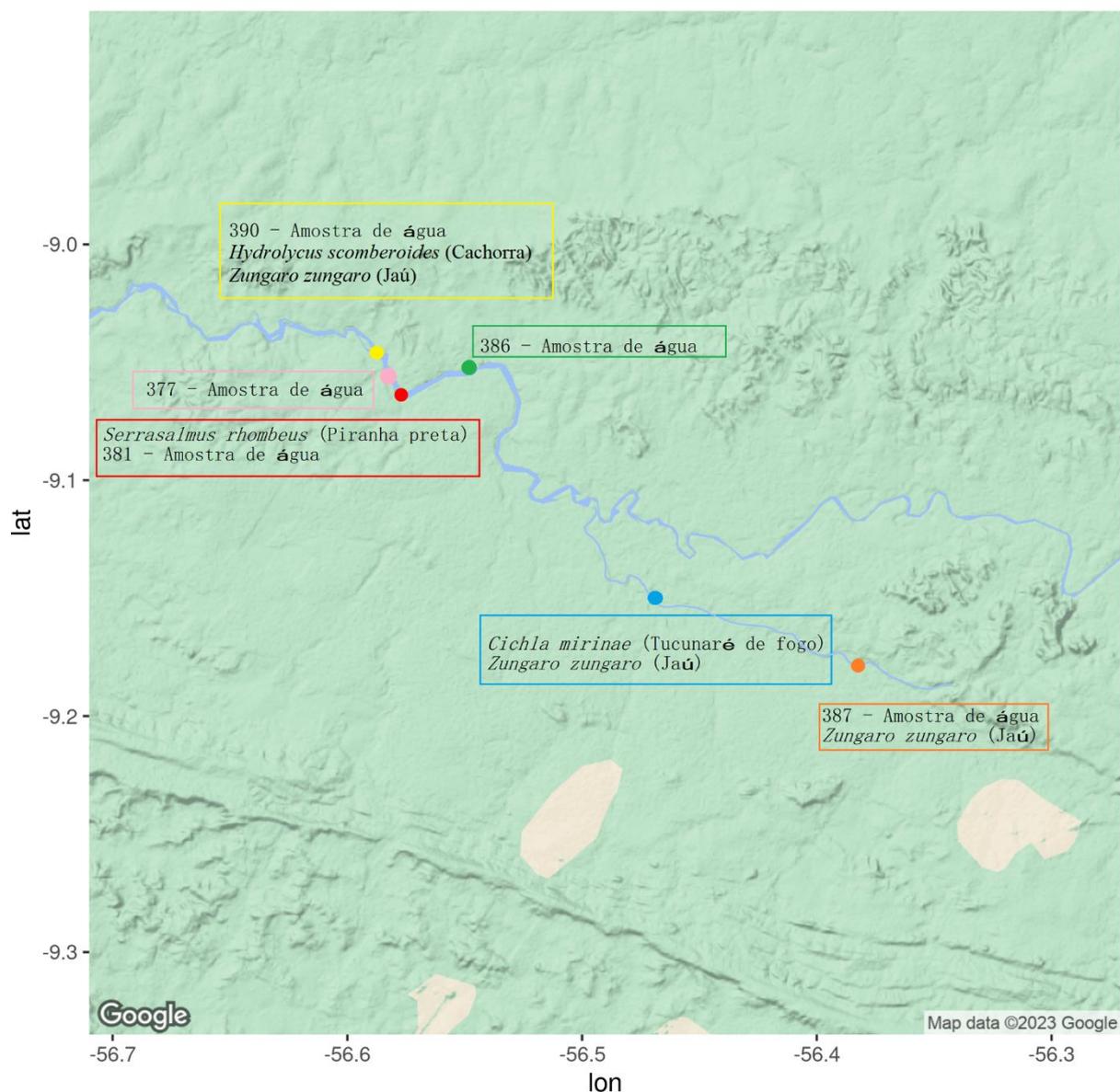


Figura 31: Mapa com os pontos de coleta no Rio São Benedito, Pará.

De acordo com a biodiversidade local do Pará, foram selecionados quatro tipos de peixes distintos, sendo determinado o número de réplicas de cinco peixes para cada gênero. Foram coletadas as espécies: *Serrasalmus rhombeus* de nome popular “piranha preta”, *Cichla mirinae* nomeada popularmente de “tucunaré”, *Zungaro zungaro* popularmente conhecido como "jaú" e *Hydrolycus scomberoides* conhecido como “cachorra”, todos são peixes ósseos (Figura 32). Foram selecionados 5 indivíduos para os peixes da espécie *S. rhombeus* e *C. mirinae*, já para os peixes das espécies *Z. zungaro* e *H. scomberoides* foram coletados 3 indivíduos (Tabela 18).

Tabela 18: Dados dos peixes e coordenadas da coleta no Rio São Benedito. Todos os pontos de coleta foram marcados por GPS, sendo apresentado nesta tabela a latitude e longitude exata da coleta de cada amostra.

Espécie / Gênero	Indivíduos	Nome popular	Coordenadas da coleta	
<i>Serrasalmus rhombeus</i>	5	piranha preta	-9.063832014799118	-56.577075021341443
<i>Cichla mirinae</i>	5	tucunaré de fogo	-9.149979036301374	-56.468773037195206
<i>Zungaro zungaro</i>	3	jaú	-9.178551016375423	-56.382367014884949
			-9.045951990410686	-56.58731603063643
<i>Hydrolycus scomberoides</i>	3	cachorra	-9.149979036301374	-56.468773037195206
			-9.045951990410686	-56.58731603063643

Para a coleta das amostras nos peixes, utilizou-se *swab*, o qual foi passado nas três regiões: boca (A), brânquias (B) conhecido popularmente como guelras e ânus (C) (Figura 33). Todos os *swabs* com as amostras foram armazenados em microtubos com 1000 µl de água peptonada alcalina (APA) e glicerol 20%, e foram mantidos em temperatura de -80°C para que posteriormente as bactérias pudessem ser isoladas e serem realizados os sequenciamentos metagenômico. Para a presente tese os dados utilizados estão apresentados na Tabela 19.

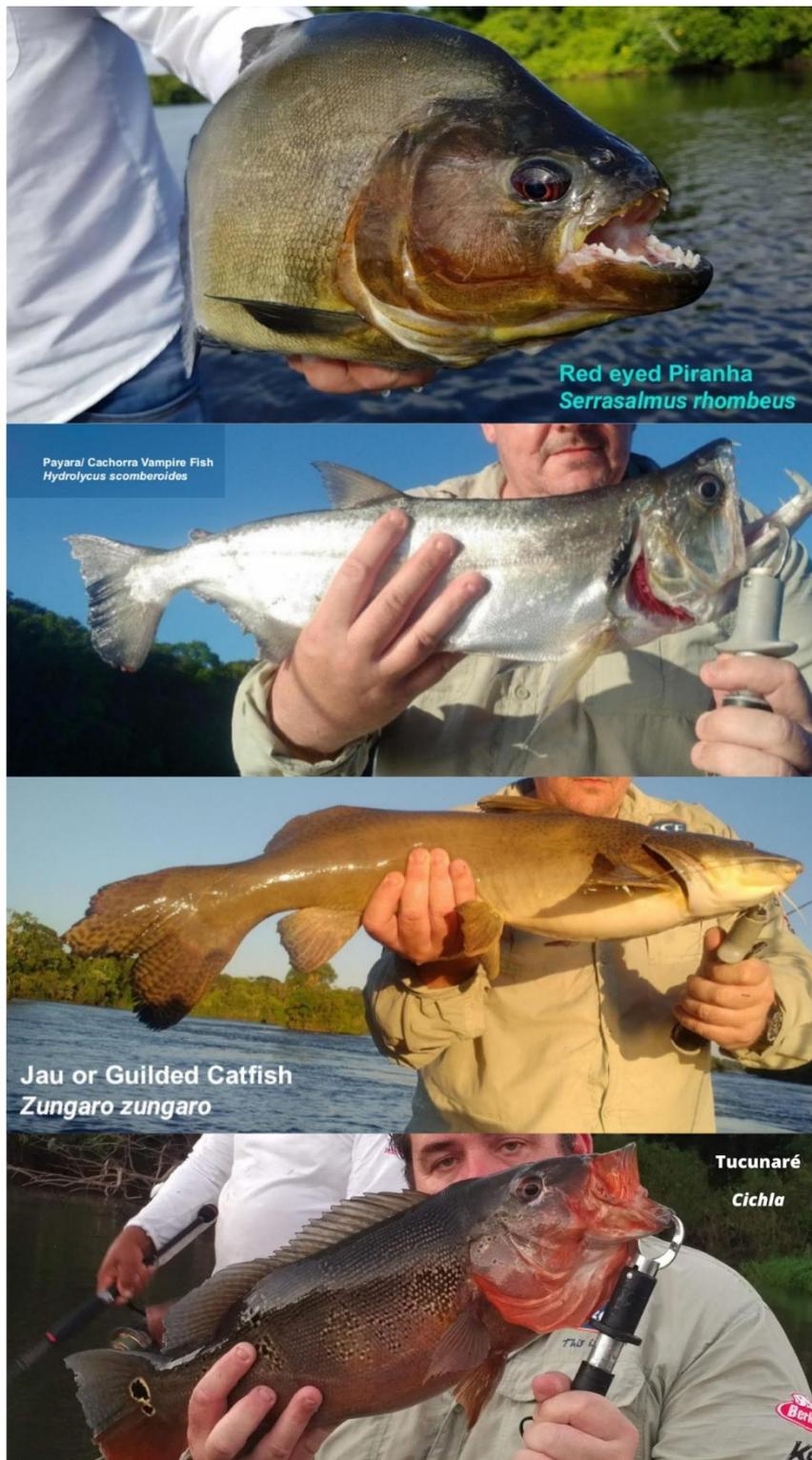


Figura 32: Foto dos peixes: *Serrasalmus rhombeus*, *Hydrolycus scomberoides*, *Zungaro zungaro* e *Cichla mirinae*, respectivamente, selecionados devido a diversidade local para realizar a coleta das amostras. Fonte: arquivo pessoal do Dr. Andrew Macrae.



Figura 33: Região da coleta das amostras nos peixes. O *swab* foi passado em três regiões: boca (A), brânquias (B) e ânus (C). Fonte: arquivo pessoal do Dr. Andrew Macrae.

Tabela 19: Amostras utilizadas na tese oriundas dos cinco indivíduos da espécie *Serrasalmus rhombeus* (nome popular: piranha preta)

Ponto de coleta	Nomenclatura das amostras	Utilização na tese
Boca (A)	1A1 - 1A2 - 1A3 - 1A4 - 1A5	Isolamento das bactérias e detecção de produção de substâncias antimicrobianas
Brânquias (B)	1B1 - 1B2 - 1B3 - 1B4 - 1B5	
Ânus (C)	1C1 - 1C2 - 1C3 - 1C4 - 1C5	Isolamento das bactérias e detecção de produção de substâncias antimicrobianas e análises metagenômicas para a bioprospecção de substâncias antimicrobianas

*Apenas a região marcada de cinza foi sequenciada e utilizada para as análises metagenômicas.

4.2.1.1.3 Coleta das amostras de água

As amostras de água do Rio São Benedito foram coletadas da zona eufótica da coluna d'água. Quatro diferentes regiões do rio São Benedito foram selecionadas. Para cada amostra de água foi coletado 500 mL usando uma seringa de 50 mL (10 vezes). A água foi filtrada com um filtro *Sterivex*TM (Merck KGaA, Cat. No. SVGP01015) com membrana Millipore Express (PES) de tamanho de poro de 0,22 µm. Assim, as células dos microrganismos maiores que 0,22 µm ficaram retidas. Os filtros foram armazenados a -80°C até o processo de extração do DNA. Os dados da coleta das amostras de águas foram apresentados na Tabela 20. Vale ressaltar que a amostra 386 foi coletada de uma parte do rio conhecida como Lagoa Azul, a qual é extremamente preservada e limpa. Assim como a amostra 377 também foi coletada de uma outra área com águas cristalinas.

Tabela 20: Dados das amostras coletadas da água do Rio São Benedito com o filtro *Sterivex*TM.

Nome da Amostra	Coordenada da coleta	
377	-9.055742975324392	-56.582917040213943
381	-9.063832014799118	-56.577075021341443
386 *	-9.052302036434412	-56.548159969970584
387	-9.178551016375423	-56.382367014884949
390	-9.045951990410686	-56.58731603063643

* Área conhecida como Lagoa Azul.

4.2.1.2 Isolamento e identificação das estirpes bacterianas do peixe *Serrasalmus rhombeus* (piranha preta)

Para realizar o isolamento das estirpes bacterianas, foram selecionados os cinco indivíduos do peixe da espécie *S. rhombeus*. Todas as amostras foram inoculadas em 4 mL de caldo nutriente em agitação, por 48 horas em temperatura de 28°C. Após as 48 horas, foram inoculadas em placas de ágar nutrientes em duplicatas, para verificar as diferentes colônias existentes em cada amostra. Todas as colônias com características fenotípicas diferentes foram semeadas em novas placas de ágar nutriente até obter a colônia isolada. Após o isolamento das estirpes bacterianas, todas as amostras foram armazenadas em tubos inclinados com ágar nutriente e também em estoque com microtubos contendo caldo nutriente e 20% de glicerol, e foram armazenados em temperatura de -80°C. As bactérias isoladas foram identificadas preliminarmente pela técnica de espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz por tempo de voo (MALDI-TOF).

4.2.1.3 Detecção da produção de substância antimicrobiana

4.2.1.3.1 Estirpes bacterianas clínicas utilizadas como indicadoras para os testes de produção de substâncias antimicrobianas para todos os gêneros produtores de estudo.

Foram selecionadas estirpes patogênicas e resistentes a diversos antibióticos para serem utilizadas como indicadoras no teste de produção de substâncias antimicrobianas. As bactérias indicadoras são estirpes patogênicas de relevância clínica, como as bactérias do grupo ESKAPE, que serão testadas para descobrir se podem ser inibidas pelas substâncias antimicrobianas secretadas pelas bactérias produtoras, isoladas neste trabalho. Foram utilizadas estirpes patogênicas de diversos gêneros, incluindo algumas com resistência à antibióticos. As 12 bactérias patogênicas utilizadas como indicadoras estão apresentadas na Tabela 21.

Tabela 21: Lista de bactérias patogênicas que foram utilizadas para o teste de antagonismo, como bactérias indicadoras.

Bactéria	Laboratório de Origem**	Taxonomista Responsável
<i>Acinetobacter baumannii</i> -Não OXA23	Laboratório de Investigação Médica	Dra. Beatriz M. Moreira
<i>Escherichia coli</i> ESBL*		
<i>Enterococcus cloacae</i> NDM*		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC*		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL*		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SPM*		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> -Não SPM		
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	Laboratório de Microbiologia de Alimentos	Dr. Marcos Miguel
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15422		
<i>Enterococcus faecalis</i> 5ae	Laboratório de Infecção Nosocomial	Dra. Kátia Regina Santos
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		

* As siglas representam os fatores de resistência das respectivas bactérias: KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*); ESBL (produtora de β -lactamase de espectro estendido); NDM (New Delhi metallo-beta-lactamase) e SPM (São Paulo metalo- β -lactamase).

** Todos os laboratórios pertencem ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG) da UFRJ.

*** Todas as bactérias marcadas com a cor cinza são representantes do grupo de bactérias patogênicas ESKAPE.

4.2.3.2 Teste de detecção da produção de substância antimicrobiana

Foram realizados testes para detectar a produção de substância antimicrobiana das 71 bactérias isoladas do peixe da espécie *S. rhombeus*. Para isso, foi realizado o teste de antagonismo com a metodologia de ensaio de difusão de poço de ágar (Tagg & McGiven, 1971). Essa técnica permite uma melhor visualização do halo de inibição. Para realizar essa técnica, primeiro foi vertido o meio semissólido com a estirpe indicadora, que são as bactérias que podem ser inibidas pelas estirpes produtoras de substância antimicrobiana, fazendo um tapete na placa de Petri contendo meio ágar nutriente. Para formar o tapete foi necessário fazer a adição de 50 µl da diluição da cultura da bactéria indicadora - ajustadas à turvação correspondente à escala 0,5 de McFarland - em quatro mL de meio ágar nutriente semissólido (1% de ágar) em estado líquido, depois de homogeneizar, este tubo é vertido sobre a placa de Petri. Após formar o tapete foram feitos pequenos poços nesta placa para aplicar 50µL da cultura das estirpes supostas produtoras de substâncias antimicrobianas, com turvação correspondente à escala 0,5 de McFarland. As placas ficaram abertas no fluxo laminar para secar e após essa etapa foram incubadas em estufa a 2°C entre 18 e 24 horas.

4.2.2 Parte II: Metagenômica das amostras bacterianas oriundas de peixes e das amostras de água

4.2.2.1 Extração de DNA e sequenciamento *shotgun* do metagenoma completo das amostras bacterianas de peixe e de águas coletadas

Para realizar o sequenciamento metagenômico das amostras, foram selecionadas as amostras oriundas dos cinco indivíduos dos peixes da espécie *Serrasalmus rhombeus* da região do ânus dos peixes. Essas amostras foram selecionadas para avaliar a biodiversidade da microbiota deste peixe. Além disso, também foram selecionadas amostras de águas do Rio São Benedito, Microbiologicamente concentradas pelo filtro *Sterivex*TM, de quatro pontos diferentes. Essas amostras foram selecionadas para verificar a biodiversidade local das bactérias, por meio do sequenciamento e das análises do metagenoma.

A extração de DNA foi realizada com o kit DNeasy® PowerSoil® Pro (QIAGEN, Cat. No./ID: 47014) e o DNA foi quantificado pelo Qubit (Invitrogen). O sequenciamento *shotgun* do metagenoma completo foi feito pela plataforma Illumina Miseq (LagBio, Paraná-Brasil), usando 1 ng de DNA para construir a biblioteca *paired-end* (2 x 300 pb) com o kit Nextera XT DNA library Prep kit v2 (Illumina, San Diego, CA, EUA). Ambas as etapas foram realizadas pela empresa LagBio - Análise Genômica e Biotecnologia, localizada em Toledo, Paraná-Brasil.

4.2.2.2 Processamento dos dados e Montagem dos *contigs* e *bins*

Primeiramente, foi realizado um controle de qualidade do sequenciamento por meio da ferramenta FastQC v0.11.9 (Andrews, 2010). Após a análise, o corte de qualidade foi feito com a ferramenta Trimmomatic v0.39 (Bolger *et al.*, 2014), com os parâmetros HEADCROP: 25, CROP: 123, removendo adaptadores, leituras com bases indefinidas (N), leituras pequenas (<36 pb) e usando o índice de qualidade Phred >30. A montagem dos *contigs* foi realizada com a ferramenta MetaSPAdes v3.15.0 (Bankevich *et al.*, 2012). Para gerar os *bins* foi utilizada a ferramenta MaxBin v2.2.4 (Wu *et al.*, 2014; Wu, Simmons & Singer, 2016) com o parâmetro “comprimento *contig* mínimo” (-min_contig_length / *minimum contig length*) para 200 pb., exceto para a amostra 1C2 que ficou com a montagem melhor sem esse parâmetro. A análise das métricas para verificar a qualidade da montagem foi realizada com a ferramenta MetaQUAST v5.0.2 (Mikheenko *et al.*, 2018), e a ferramenta CheckM v1.1.3 (Parks *et al.*, 2014) foi usada para verificar a integridade e contaminação.

4.2.2.3 Avaliação da biodiversidade - classificação taxonômica dos metagenomas

Para realizar a identificação taxonômica dos *bins* gerados no *Metagenome Assembled Genome* (MAG) foi utilizada a ferramenta CheckM v1.1.3 (Parks *et al.*, 2014), como também a ferramenta MG-RAST v. 4.0.3 (<https://www.mg-rast.org/>; Keegan *et al.*, 2016) foi escolhida para avaliação do perfil taxonômico dos grupos de dados metagenômico. A ferramenta MG-RAST faz a normalização dos dados para gerar as tabelas com as OTUs (Gêneros). A linguagem de programação R foi utilizada com o pacote Phyloseq (McMurdie &, Holmes, 2013; R Core Team, 2022) e pacote

fantaxtic/ggnested (Teunisse, 2022) para realizar análises das comunidades microbianas encontradas em cada metagenoma, assim como a alfa e beta diversidade.

Para as análises de alfa diversidade, o pacote do R Phyloseq faz a normalização dos dados, pela profundidade mediana do sequenciamento. Foi realizada as análises com o estimador de riqueza Chao1 e o estimador de diversidade Shannon. Para as análises de beta diversidade todos os dados foram transformados em abundância relativa. Foi realizada a redução de dimensionalidade da matriz de distância Bray-Curtis para relações genéticas entre espécies, usando a abordagem de Análise de Coordenadas Principais (PCoA). Assim como, também foi construído um gráfico *boxplot* para visualizar a distribuição dos metagenomas e comparar os dois grandes grupos de amostragens (água e peixe).

4.2.2.4 Avaliação funcional de metagenomas e anotação das montagens dos contigs

A prospecção de proteínas potenciais foi realizada com o programa Prodigal v2.6.3 (Hyatt *et al.*, 2010), que prevê quadros de leitura aberta (ORFs). Os *contigs* foram anotados com o programa *Rapid Prokaryotic Genome Annotation* (PROKKA) v 1.12 (Seemann, 2014) com o parâmetro `--metagenome`, buscando genes de interesse. A atribuição de ortologia e mapeamento de vias metabólicas foi realizada pelas ferramentas *KEGG Automatic Annotation Server* (KAAS) (Moriya *et al.*, 2007) e *KEGG Mapper Reconstruction* (Kanehisa & Sato, 2020). Todos os gráficos foram gerados com a linguagem de programação R (R Core Team, 2022). A busca por sequências de plasmídeos foi realizada pela ferramenta PlasmidFinder 2.1 (Carattoli & Hasman, 2020). Para avaliar o potencial de virulência a ferramenta *Mass screening of contigs for antimicrobial resistance or virulence genes* (ABRIcate) v 1.0.1 (Seemann, 2020) foi utilizada com os bancos de dados: *Bacterial Antimicrobial Resistance Reference Gene Database* (NCBI AMRFinderPlus), *The Comprehensive Antibiotic Resistance Database* (CARD), *Antimicrobial resistance* (Resfinder), *Antibiotic Resistance Gene-ANNOTation* (ARG-ANNOT), *Microbial Ecology Group Antimicrobial Resistance Database* (MEGARes), *E. coli O-groups and H-types* (EcOH), *Identification and typing of Plasmid Replicons* (PlasmidFinder), *Escherichia coli Virulence Factor* (Ecoli_VF) e *Virulence Factor Database* (VFDB).

4.2.2.5 Mineração de genes relativos a substâncias antimicrobianas em metagenomas

A ferramenta *Antibiotics and Secondary Metabolite Analysis Shell* (AntiSMASH) v6.0.1 (Medema *et al.*, 2011; Blin *et al.*, 2021) foi utilizada para buscar sequências relacionadas à bacteriocinas e metabólitos secundários.

Além dessa análise, os metagenomas também foram analisados por meio do BLASTp v.2.11.0+ (Altschul *et al.*, 1990), utilizado para pesquisar proteínas relacionadas com a produção de substâncias antimicrobianas. Para isso, os bancos de dados utilizados foram: *Bacteriocin Genome Mining tool* (BAGEL) classe I, II e III com a versão mais atual do banco de dados, atualizado no dia 21 de dezembro de 2021 (Van Heel *et al.*, 2013); banco de dados BACTIBASE com a última atualização do banco de dados, realizada no dia 20 de maio de 2017 (Hammami *et al.*, 2010); e algumas proteínas relacionadas à produção de bacteriocinas foram selecionadas no banco de dados do servidor da UniProt (UniProt consortium, 2021), como as proteínas de produção da zoocina (ZooA) e a de produção da colicina V (Cvpa). Essa análise foi realizada com o proteoma (fasta aminoácido/.faa), predito pela ferramenta PROKKA *Rapid Prokaryotic Genome Annotation* (PROKKA) v1.14.6 (Seemann, 2014).

4.3 - Resultados

4.3.1 Parte I: Isolamento e identificação das bactérias oriundas dos peixes e detecção da produção de substâncias antimicrobianas

4.3.1.1 Bactérias isoladas do peixe *Serrasalmus rhombeus* e Identificação preliminar (MALDI-TOF)

Um total de 71 bactérias foram isoladas, sendo na parte da boca (A) 27 estirpes, nas brânquias (B) 18 estirpes e no ânus (C) 26 estirpes. Dentre essas, 34 possuem morfologia diferente ou não foram identificadas (Tabela 22 - marcadas de cinza), sendo 18 da região da boca (A); 6 da região das brânquias (B) e 10 da região do ânus (C). As colônias foram descritas morfológicamente pelos seguintes quesitos: pigmentação (ausente ou presente); opacidade/transparência (opaca, translúcida, transparente ou iridescente); brilho: fosca ou brilhante; forma (circular, irregular, puntiforme); margem

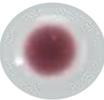
(fimbriado; denticulado; ondulada ou inteira); consistência (quebradiça, cremosa ou mucóide); textura (lisa ou rugosa), elevação (espraiada; elevada; convexa; bosselada ou papilada) e tamanho. Os aspectos visualizados foram selecionados de acordo com Vermelho e colaboradores (2006) e Sousa, Pereira e Lourenço (2015).

Em relação à identificação realizada pelo MALDI-TOF, pôde-se identificar 48 estirpes dentre das 71. Já sendo de espécies diferentes, foi possível identificar 14 bactérias. Sendo pertencentes aos gêneros: *Bacillus* (*B. amyloliquefaciens* ssp; *B. subtilis* e *B. velezensis*); *Brevibacterium* (*B. celere*); *Kocuria* (*K. rhizophila*); *Microbacterium* (*M. paraoxydans*), *Priestia* (*P. megaterium*); *Serratia* (*S. marcescens*); *Sphingomonas* (*S. aquatilis*) e *Staphylococcus* (*S. gallinarum*; *S. saprophyticus*; *S. sciuri* e *S. warneri*). 23 bactérias não foram identificadas pela técnica de espectrometria de massa, MALDI-TOF. A Tabela 22 apresenta os resultados das bactérias isoladas.

Tabela 22: Características fenotípicas das bactérias isoladas dos 5 indivíduos do peixe da espécie *Serrasalmus rhombeus* e sua identificação pela espectrometria de massa (MALDI-TOF). As 34 estirpes bacterianas com morfologia diferente ou não identificadas estão marcadas de cinza na tabela. Os valores de pontuação do MALDI-TOF são: 2.0 - 3.0 significa identificação de grande fiabilidade; 1.70 - 1.99 significa identificação de baixa fiabilidade e 0.00 - 1.69 significa identificação de organismo impossível.

Características Morfológicas da colônia									
Estirpe	Pigmentação	Opacidade/ Brilho	Forma	Margem	Consistência	Elevação	Tamanho/ Textura	Identificação MALDI-TOF	Foto da colônia
Sr1/1A1-I	Branca	Transparente/ e/brilhante	Circular	Ondulada	Creмоса	Espraiada	0.4 cm / Rugosa	Não Identificou	
Sr2/1A1-II	Vermelha/ Borda branca	Translúcida/ Brilhante	Circular	Inteira	Creмоса	Convexa	0.3 cm / Lisa	Não Identificou	
Sr3/1A1-III	Branca	Translúcida/ Brilhante	Circular	Inteira	Creмоса	Espraiada	0.1 cm (Micro) / Lisa	<i>Staphylococcus warneri</i> / 1.95	
Sr4/1A1-IV	Bege Amarelada	Opaca / Brilhante	Circular	Inteira	Creмоса	Umbilicada	0.3 cm /Lisa	<i>Staphylococcus sciuri</i> / 2.02	
Sr5/1A1-V	Branca	Translúcida/ Brilhante	Irregular	Denticula da	Creмоса	Espraiada	0.5 cm / Lisa	<i>Bacillus subtilis</i> / 2.07	
Sr6/1A1-VI	Bege Amarelada	Opaca / Brilhante	Circular	Inteira	Creмоса	Umbilicada	0.3 cm /Lisa	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> / 2.10	
Sr7/1A1-VII	Branca	Translúcida/ Brilhante	Irregular	Denticula da	Creмоса	Espraiada	0.5 cm / Rugosa	<i>Bacillus subtilis</i> / 2.07	
Sr8/1A1-VIII	Vermelha/ Borda branca	Translúcida/ Brilhante	Circular	Inteira	Creмоса	Convexa	0.3 cm / Lisa	<i>Serratia marcescens</i> / 2.34	

Continuação da Tabela 22

Estirpe	Pigmentação	Opacidade/ Brilho	Forma	Margem	Consistência	Elevação	Tamanho/ Superfície	Identificação MALDI-TOF	Foto da colônia
Sr9/1A1-IV	Amarela	Translúcida/ Brilhante	Circular	Inteira	Cremosa	Convexa	0.2 cm / Lisa	<i>Microbacterium paraoxydans</i> / 2.58	
Sr11/1A1-XI	Branca	Translúcida/ Brilhante	Circular	Ondulada	Cremosa	Espraiada	0.2 cm / Lisa	Não Identificou	
Sr12/1A1-XII	Branca	Translúcida/ Brilhante	Circular	Inteira	Cremosa	Convexa	0.3 cm / Lisa	Não Identificou	
Sr81 / 1A1- XII	Branca	Translúcid a / Brilhosa	Circular	Inteira	Cremosa	Espraiada	0.3 cm / Lisa	<i>Staphylococcus gallinarum</i> / 1.779	
Sr13/1A2-I	Branca	Opaca / fosca	Irregular	Ondulada	Cremosa	Papilada	0.7 cm / Rugosa	<i>Bacillus subtilis</i> / 2.13	
Sr14/1A2-II	Vermelha/ Borda branca	Translúcida/ Brilhante	Circular	Inteira	Cremosa	Convexa	0.3 cm / Lisa	<i>Serratia marcescens</i> / 2.30	
Sr15/1A2-III	Vermelha/ Borda branca	Translúcida/ Brilhante	Circular	Inteira	Cremosa	Convexa	0.3 cm / Lisa	<i>Serratia marcescens</i> / 2.38	
Sr17/1A2-IV	Branca	Translúcida/ Brilhante	Irregular	Denticula da	Cremosa	Espraiada	0.6 cm / Lisa	<i>Bacillus subtilis</i> / 1.84	
Sr16/1A3-I	Branca	Translúcida/ Brilhante	Irregular	Denticula da	Cremosa	Espraiada	0.4 cm / Rugosa	<i>Bacillus subtilis</i> / 1.74	
Sr18/1A3-II	Branca	Opaca/ Fosca	Irregular	Ondulada	Cremosa	Umbilicada	0.6 cm / Rugosa	Não Identificou	

Continuação da Tabela 22

Estirpe	Pigmentação	Opacidade/ Brilho	Forma	Margem	Consistência	Elevação	Tamanho/ Superfície	Identificação MALDI-TOF	Foto da colônia
Sr19/1A3-III	Branca	Opaca/ Fosca	Irregular	Ondulada	Creмоса	Umbilicada	0.6 cm / Rugosa	Não Identificou	
Sr20/1A4-I	Branca	Opaca/ Fosca	Irregular	Inteira	Creмоса	Espraiada	0.4 cm / Lisa	Não Identificou	
Sr21- 10P/1A4-II	Vermelha/ Borda branca	Translúcida/ Brilhante	Circular	Inteira	Creмоса	Convexa	0.3 cm / Lisa	<i>Serratia marcescens</i> / 2.15	
Sr22/1A4-III	Branca Forte	Opaca / Brilhante	Irregular	Ondulada	Creмоса	Papilada	0.5 cm / Rugosa	Não Identificou	
Sr23/1A4-IV	Vermelha/ Borda branca	Translúcida/ Brilhante	Circular	Inteira	Creмоса	Convexa	0.3 cm / Lisa	<i>Serratia marcescens</i> / 2.28	
Sr24/1A5-I	Amarela	Translúcid a/Brilhante	Circular	Inteira	Creмоса	Convexa	0.2 cm / Lisa	Não Identificou	
Sr25/1A5-II	Branca	Opaca / Fosca	Irregular	Denticula da	Quebradiça	Espraiada	0.6 cm / Lisa	Não Identificou	
Sr26/1A5-III	Branca	Opaca/ Fosca	Irregular	Ondulada	Quebradiça	Espraiada	0.4 / Rugosa	Não Identificou	
Sr27/1A5-IV	Branca col.	Translúcida/ Brilhante	Irregular	Denticula da	Creмоса	Espraiada	0.5 cm / Lisa	Não Identificou	
Sr28/1B1-I	Branca	Translúcida/ Brilhante	Circular	Inteira	Creмоса	Espraiada	0.2 cm / Lisa	Não Identificou	

Continuação da Tabela 22

Estirpe	Pigmentação	Opacidade/ Brilho	Forma	Margem	Consistência	Elevação	Tamanho/ Superfície	Identificação MALDI-TOF	Foto da colônia
Sr29/1B1-II	Vermelha/ Borda branca	Translúcida/ Brilhante	Circular	Inteira	Creмоса	Convexa	0.3 cm / Lisa	<i>Serratia marcescens</i> / 2.20	
Sr80 /1B1-V	Bege Amarelada	Translúcid a / Brilhosa	Circular	inteira	Creмоса	Espraiada	0.3 cm / Lisa	<i>Staphylococcus warneri</i> / 1.901	
Sr30/1B1-III	Branca	Opaca/ Fosca	Irregular	Denticula da	Quebradiça	Espraiada	0.5 cm / Rugosa	<i>Bacillus subtilis</i> / 2.15	
Sr31/1B1-IV	Vermelha/ Borda branca	Translúcida/ Brilhante	Circular	Inteira	Creмоса	Convexa	0.3 cm / Lisa	<i>Serratia marcescens</i> / 2.38	
Sr32/1B2-I	Branca	Opaca/ Brilhosa	Circular	Inteira	Creмоса	Espraiada	0.2 cm / Lisa	Não Identificou	
Sr33-1P/1B2- II	Vermelha/ Borda branca	Translúcida/ Brilhante	Circular	Inteira	Creмоса	Convexa	0.3 cm / Lisa	<i>Serratia marcescens</i> / 2.11	
Sr34-2P/1B2- III	Branca	Transparen te/Brilho	Circular	Inteira	Creмоса	Convexa	0.5 cm / Lisa	<i>Bacillus amyloliquefacie ns_ssp_plantar um</i> / 1.74	
Sr36/1B3-II	Branca	Opaca/ Fosca	Irregular	Ondulada	Quebradiça	Espraiada	0.6 cm / rugosa	<i>Bacillus subtilis</i> / 2.16	
Sr37/1B3-III	Bege Amarelada	Translúcid a / Brilhosa	Circular	Inteira	Creмоса	Espraiada	0.3 cm / Lisa	<i>Staphylococcus sciuri</i> / 2.11	

Continuação da Tabela 22

Estirpe	Pigmentação	Opacidade/ Brilho	Forma	Margem	Consistência	Elevação	Tamanho/ Superfície	Identificação MALDI-TOF	Foto da colônia
Sr38/1B3-IV	Amarela	Transparente / Brilhosa	Circular	Inteira	Cremosa	Convexa	0.1 cm / Lisa	<i>Microbacterium paraoxydans / 2.44</i>	
Sr39/1B4-I	Branca	Opaca/ Fosca	Irregular	Ondulada	Quebradiça	Espraiada	0.4 / Rugosa	<i>Bacillus subtilis / 2.16</i>	
Sr40/1B4-II	Branca	Translúcida / Brilhosa	Circular	inteira	Cremosa	Espraiada	0.3 cm / Lisa	<i>Staphylococcus sciuri / 2.03</i>	
Sr41/1B4-III	Branca	Translúcida / Fosca	Circular	inteira	Cremosa	Espraiada	0.6 cm / Rugosa	<i>Priestia megaterium / 2.23</i>	
Sr42/1B4-IV	Branca	Translúcida / Fosca	Circular	inteira	Cremosa	Espraiada	0.6 cm / Rugosa	<i>Priestia megaterium / 2.31</i>	
Sr43/1B4-V	Branca	Opaca/ Brilhosa	Irregular	Ondulada	Mucosa	Convexa baixa	0.4 cm / Lisa	<i>Bacillus velezensis / 2.04</i>	
Sr44/1B5-I	Branca	Opaca/ Brilhosa	Irregular	Ondulada	Mucosa	Convexa baixa	0.4 cm / Lisa	<i>Bacillus subtilis/ 2.00</i>	
Sr45/1B5-II	Branca	Opaca / Fosca	Irregular	Ondulada	Quebradiça	Espraiada	0.5 cm / Lisa	Não identificou	
Sr46/1C1-I	Vermelha/ Borda branca	Translúcida/ Brilhante	Circular	Inteira	Cremosa	Convexa	0.3 cm / Lisa	Não identificou	
Sr47/1C1-II	Branca	Opaca / Fosca	Irregular	Ondulada	Cremosa	Espraiada	0.5 cm / Rugosa	<i>Bacillus subtilis / 2.28</i>	
Sr48/1C1-III	Amarela	Translúcida/ Brilhante	Circular	Inteira	Cremosa	Convexa	0.1 cm / Lisa	<i>Microbacterium paraoxydans / 1.81 (apenas 1)</i>	

Continuação da Tabela 22

Estirpe	Pigmentação	Opacidade/ Brilho	Forma	Margem	Consistência	Elevação	Tamanho/ Superfície	Identificação MALDI-TOF	Foto da colônia
Sr49/1C1-IV	Branca	Opaca / Fosca	Irregular	Ondulada	Mucosa	Convexa	0.6 cm	<i>Bacillus velezensis</i> / 1.8	
Sr50/1C1-V	Amarela	Translúcida/ Brilhante	Circular	Inteira	Cremosa	Convexa	0.1 cm / Lisa	<i>Microbacterium paraoxydans</i> / 1.81	
Sr51/1C1-VI	Branca	Translúcida/ Brilhante	Circular	Inteira	Cremosa	Convexa	0.1 cm / Lisa	<i>Brevibacterium celere</i> / 2.30	
Sr52/1C1-VII	Branca	Opaca / Fosca	Irregular	Ondulada	Cremosa	Espraiada	0.3 cm	<i>Priestia megaterium</i> / 2.30	
Sr53/1C1- VIII	Amarela	Translúcida/ Brilhante	Circular	Inteira	Cremosa	Convexa	0.1 cm / Lisa	<i>Sphingomonas aquatilis</i> / 1.99	
Sr54/1C1-IX	Branca	Opaca / Fosca	Irregular	Ondulada	Quebradiça	Espraiada	0.5 cm / Rugosa	<i>Bacillus subtilis</i> / 2.12	
Sr55/1C1-X	Amarela	Transparen te / Brilhosa	Circular	Inteira	Cremosa	Convexa	0.1 cm / Lisa	<i>Microbacterium sp</i>	
Sr71- 3P/ 1C1-XI	Amarela	Translúcia / Brilhosa	Circular	Inteira	Cremosa	Convexa	0.1 cm / Lisa	Não identificou	
Sr72 - 4P/ 1C1-XII	Branca	Opaca / Fosca	Irregular	Inteira	Cremosa	Espraiada	0.6 cm / Lisa	Não identificou	
Sr78 / 1C1- XIII	Laranja- amarelo	Translúcida/ Brilhante	Circular	Inteira	Cremosa	Convexa	0.3 cm / Lisa	<i>Kocuria rhizophila</i> / 2.032	

Continuação da Tabela 22

Estirpe	Pigmentação	Opacidade/ Brilho	Forma	Margem	Consistência	Elevação	Tamanho/ Superfície	Identificação MALDI-TOF	Foto da colônia
Sr57/1C2-II	Vermelha/ Borda branca	Translúcida/ Brilhante	Circular	Inteira	Cremosa	Convexa	0.3 cm / Lisa	<i>Serratia marcescens</i> / 2.30	
Sr58/1C2-III	Branca	Opaca / Brilhosa	Irregular	Ondulada	Cremosa	Espraiada	0.4 cm / Lisa	<i>Bacillus subtilis</i> / 2.23	
Sr59/1C2-IV	Branca	Opaca / Brilhosa	Irregular	Ondulada	Mucosa	Espraiada	0.4 cm / Lisa	<i>Bacillus subtilis</i> / 2.23	
Sr60/1C2-V	Branca	Opaca / Brilhosa	Irregular	Ondulada	Cremosa	Espraiada	0.3 cm / Lisa	<i>Bacillus subtilis</i> / 1.86	
Sr61/1C2-VI	Branca/	Opaca / Brilhosa	Irregular	Ondulada	Cremosa	Espraiada	0.4 cm / Lisa	<i>Bacillus subtilis</i> / 2.23	
Sr62/1C2-VII	Branca	Opaca / Brilhosa	Irregular	Ondulada	Cremosa	Espraiada	0.4 cm / Lisa	<i>Bacillus subtilis</i> / 2.24	
Sr73-5P/ 1C2-VIII	Branca	Opaca / Fosca	Irregular	Ondulada	Cremosa	Espraiada	0.5 cm / Lisa	Não identificou	
Sr 74-6P/ 1C2-IX	Amarela	Translúcia / Brilhosa	Circular	Inteira	Cremosa	Convexa	0.1 cm / Lisa	Não identificou	
Sr75-7P/ 1C1-I	Vermelha/ Borda branca	Translúcida/ Brilhante	Circular	Inteira	Cremosa	Convexa baixa	0.3 cm / Lisa	<i>Serratia marcescens</i> / 2.21	
Sr63/1C3-II	Branca	Opaca / Brilhosa	Irregular	Ondulada	Cremosa	Espraiada	0.4 cm / Lisa	<i>Bacillus subtilis</i> / 2.19	

Continuação da Tabela 22

Estirpe	Pigmentação	Opacidade/ Brilho	Forma	Margem	Consistência	Elevação	Tamanho/ Superfície	Identificação MALDI-TOF	Foto da colônia
Sr64/1C3-III	Branca	Opaca / Fosca	Irregular	Ondulada	Cremosa	Espraiada	0.4 cm / Lisa	<i>Bacillus subtilis</i> / 2.27	
Sr76-8P/ 1C4-II	Branca	Opaca / Fosca	Circular	Inteira	Cremosa	Espraiada	0.5 cm / Lisa	Não identificou	
Sr77-9P/ 1C4-III	Amarela	Translúcid a / Brilhosa	Circular	Inteira	Cremosa	Convexa	0.1 cm / Lisa	Não identificou	

4.3.1.2 Detecção de produção de substâncias antimicrobianas – teste de antagonismo

Todas as bactérias isoladas foram testadas quanto à atividade antimicrobiana pelo teste de antagonismo. Entre as 71 bactérias isoladas, 45 mostraram atividade antimicrobiana contra alguma das bactérias patogênicas. A Figura 34 apresenta as estirpes produtoras e o perfil de atividade exercida por elas. A estirpe Sr1 foi capaz de inibir 8 das 12 estirpes testadas, apresentando o maior espectro de ação em relação às outras estirpes testadas. Seguida da estirpe Sr5, que conseguiu inibir 7 das 12 bactérias indicadoras testadas. A estirpe Sr33/1P também se destacou por conseguir inibir 6 bactérias indicadoras e a estirpe Sr7 inibiu 5 bactérias indicadoras. Três estirpes (Sr2, Sr14 e Sr57) conseguiram inibir 4 bactérias patogênicas. Dez estirpes (Sr4, Sr8, Sr15, Sr45, Sr46, Sr52, Sr71/3P, Sr59, Sr61, Sr75/7P e Sr76/8P) foram capazes de inibir 3 bactérias patogênicas. As demais inibiram entre 1 à 2 estirpes patogênicas. Apenas a bactéria *Enterococcus faecalis* 5ae não foi inibida.

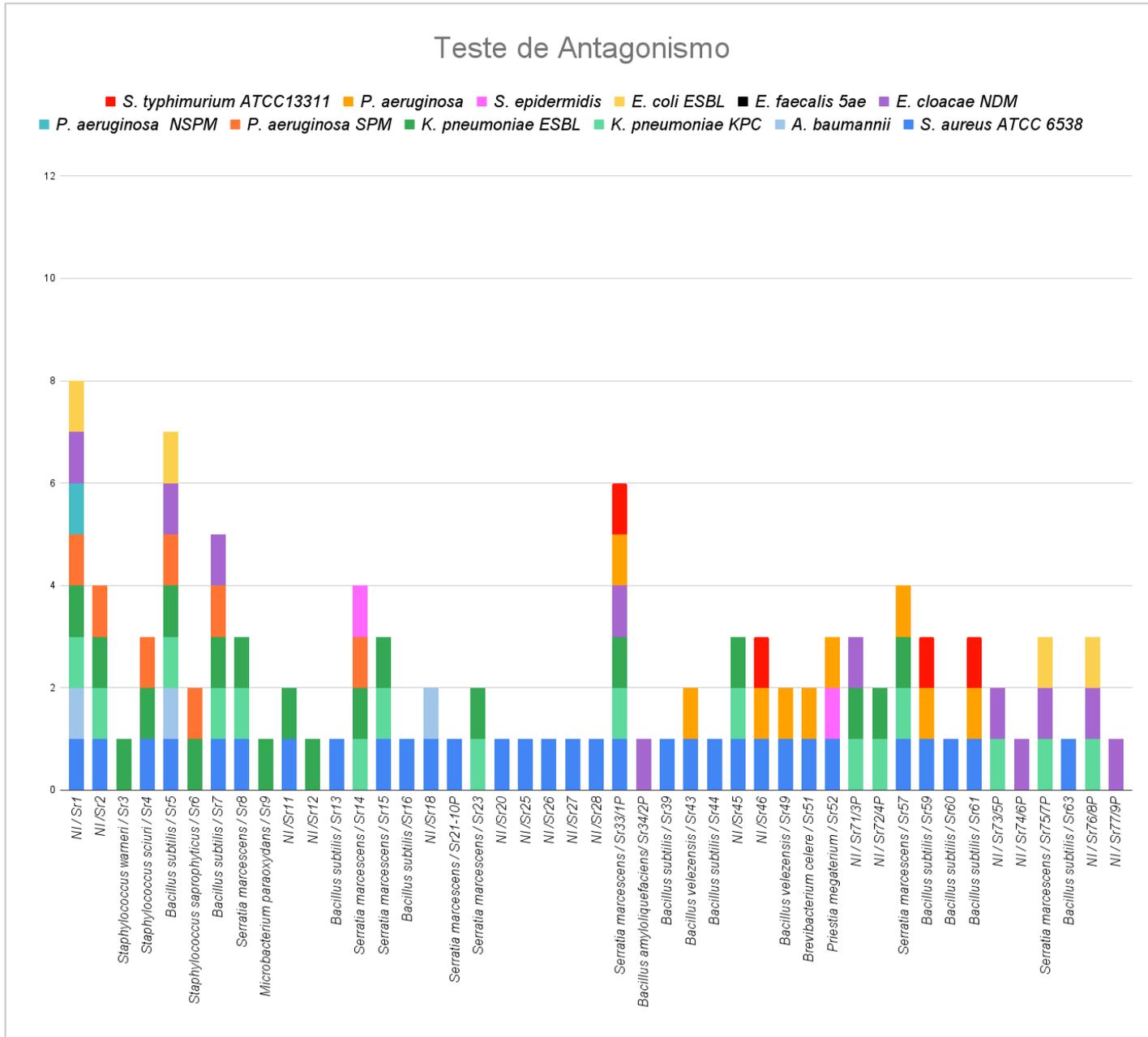


Figura 34: Gráfico de barras empilhadas apresentando as estirpes indicadoras patogênicas e estirpes produtoras de substâncias antimicrobianas. No eixo X estão presentes as bactérias isoladas dos cinco indivíduos do peixe *Serrasalmus rhombeus*, as quais apresentaram algum tipo de atividade antimicrobiana contra alguma das 12

indicadoras. O eixo Y indica a quantidade de bactérias patogênicas que foram inibidas pelas produtoras. Cada cor representa uma das bactérias patogênicas utilizadas, assim como está indicado na legenda do gráfico. NI indica que a estirpe não foi identificada pela técnica do MALDI-TOF.

Dentre as estirpes testadas, 26 estirpes isoladas dos cinco indivíduos do peixe *S. rhombeus* não foram capazes de inibir o crescimento das bactérias patogênicas utilizadas, sendo elas: Sr17, Sr19, Sr22, Sr24, Sr29, Sr30, Sr31, Sr32, Sr36, Sr37, Sr38, Sr40, Sr41, Sr42, Sr47, Sr48, Sr50, Sr53, Sr54, Sr55, Sr58, Sr62, Sr64, Sr78, Sr80 e Sr81.

A placa representando o teste de antagonismo está apresentada na Figura 35, a bactéria patogênica utilizada como indicadora foi a *Klebsiella pneumoniae* KPC.



Figura 35: Amostras testadas para verificar a produção de substâncias antimicrobianas: I= Sr51; VI= Sr53 e VIII= Sr72-4P/ 1C1-XII (positiva para o teste). Como bactéria indicadora foi utilizada a *Klebsiella pneumoniae* KPC.

4.3.2 -Parte II: metagenômica das cinco amostras oriundas da região (C) ânus dos peixes *Serrasalmus rhombeus* e quatro amostras de água do Rio São Benedito, Pará.

4.3.2.1 Extração de DNA e sequenciamento *shotgun* dos metagenomas das amostras de peixe e de águas coletadas

A quantificação da extração de DNA das amostras do peixe *S. rhombeus* resultou em 4 ng/μL, 2,3 ng/μL, 5 ng/μL, 11 ng/μL e 2 ng/μL de DNA para as amostras 1C1, 1C2, 1C3, 1C4 e 1C5, respectivamente. A quantificação da extração de DNA das amostras de água por filtros *Sterivex*TM resultou em: 2 ng/μL de DNA para 377 e 387 amostras e 3 ng/μL e 1 ng/μL de DNA para as amostras 381 e 390, respectivamente. O sequenciamento *shotgun* de todo o metagenoma gerou o total de leituras brutas de 177.320, 303.434; 113.932; 170.650 e 117.912 para as amostras 1C1, 1C2, 1C3, 1C4 e 1C5, respectivamente. As amostras de água dos filtros *Sterivex*TM geraram leituras brutas totais de 265.444; 243.266; 152.614 e 221.424, respectivamente. Já a amostra 386 não obteve um rendimento satisfatório no sequenciamento, sendo descartada das análises.

4.3.2.2 Processamento dos dados e montagem dos *contigs* e *bins*

Todas as leituras brutas passaram no filtro de controle de qualidade (Q30) feito pela ferramenta Trimmomatic. As amostras do peixe *S. rhombeus* foram montadas em *contigs* pelo MetaSPAdes, resultando em 2,6 Mb; 6,4 Mb; 2,8 Mb; 3,5 Mb e 2,8 Mb para 1C1, 1C2, 1C3, 1C4 e 1C5, respectivamente. Para as amostras de água, a montagem dos *contigs* resultaram em: 697.359 pb; 1,5 Mb; 739.978 pb e 997.581 pb para as amostras 377, 381, 387 e 390, respectivamente. Os resultados da montagem dos *contigs* foram mostrados na Tabela 23.

Tabela 23: Estatísticas geradas pelo CheckM para as montagens dos *contigs* pela ferramenta MetaSPAdes.

Amostra	Nomenclatura	#Sequências	Tamanho total (bp)	Maior <i>contig</i> (bp)	Menor <i>contig</i> (bp)	Tamanho médio
Amostra da parte (C) Ânus dos peixes <i>Serrasalmus rhombeus</i>	1C1	7,767	2,662,247	5,284	56	343
	1C2	15,472	6,413,150	3,559	56	414
	1C3	5,609	2,830,567	6,799	56	505
	1C4	8,947	3,539,344	5,264	56	396
	1C5	8,322	2,843,095	5,190	56	342
Amostra de água /filtro <i>Sterivex™</i>	377	3,083	697,359	1,867	56	226
	381	5,971	1,529,188	1,479	56	256
	387	3,133	739,978	735	56	236
	390	4,208	997,581	616	56	237

A técnica, *Metagenoma Assembled Genome* (MAG), para montar os genomas por meio dos metagenomas foi realizada com a ferramenta MaxBin v2.2.4 e resultou em 2 *bins* para cada amostra. Assim como, também foram verificadas as métricas de montagem e classificação taxonômica dos *bins* montados. Os resultados estão apresentados na Tabela 24.

Tabela 24: Métricas geradas pela ferramenta CheckM para avaliar as montagens dos *bins* com a ferramenta MaxBin. * representa a amostra que o *bin* foi gerado sem o parâmetro (*-min_contig_length / minimum contig length*) para 200pb. K= Reino; P= Filo; C= Classe, O= Ordem; F= Família; G= Gênero e S=Espécie.

Amostra	Nome do Bin	Tamanho do Genoma (pb)	Completeness (%)	Contaminação	% GC	#Contigs	Maior contig	Classificação CheckM	
Amostra da parte (C) Ânus dos peixes <i>Serrasalmus rhombeus</i>	1C1	MAG_1C 1.1	1,383,323	58.13	6.3	35.40	2,912	5,284	Bacilli (C)
		MAG_1C 1.2	1,262,883	29.54	6.7	58.95	4,730	1,756	Actinomicetos (O)
	1C2*	MAG_1C 2.1	362,225	12.62	0	69.67	298	3,559	Actinomicetos (O)
		MAG_1C 2.2	626,913	14.67	0	73.50	565	3,489	Bactéria (K)
	1C3	MAG_1C 3.1	1,381,382	35.89	3.4	45.11	2,050	4,529	Bactéria (K)
		MAG_1C 3.2	1,443,084	37.26	4.7	40.99	3,735	6,799	Lactobacillales (O)
	1C4	MAG_1C 4_1	1,641,090	73.99	18.10	57.05	3,105	5,264	Bactéria (K)
		MAG_1C 4_2	1,888,649	41.96	14.74	61.02	5,896	2,254	Actinomicetos (O)
	1C5	MAG_1C 5.1	1,500,445	48.54	8.5	67.23	3,553	5,190	Actinomicetos (O)
		MAG_1C 5.2	1,338,440	33.35	5.2	63.34	4,795	3,225	Actinomicetos (O)

Continuação da tabela 24

Amostra	Nome do <i>Bin</i>	Tamanho do Genoma (pb)	Completeness (%)	Contaminação	%GC	#Contigs	Maior contig	Classificação CheckM	
Amostra de água /filtro Sterivex™	377	MAG_37 7.1	268,453	10.42	0.15	59. 56	1,081	1,867	Bactéria (K)
		MAG_37 7.2	426,780	9.95	0	62. 07	1,978	750	Bactéria (K)
	381	MAG_38 1.1	765,688	15.18	1.9	72. 50	2,646	289	Actinobacteria (P)
		MAG_38 1.2	760,639	15.78	0.86	68. 21	3,296	230	Bactéria (K)
	387	MAG_38 7.1	327,139	5.56	0	65. 59	1,233	735	Bactéria (K)
		MAG_38 7.2	410,141	8.9	0	64. 50	1,869	392	Bactéria (K)
	390	MAG_39 0.1	453,760	9.82	0.31	60. 24	1,726	616	Bactéria (K)
		MAG_39 0.2	541,151	7.83	0.86	62. 90	2,455	527	Bactéria (K)

4.3.2.3 Avaliação da biodiversidade - classificação taxonômica dos metagenomas

A biodiversidade foi avaliada pela ferramenta MG-RAST e foi comparada pelo pacote R Phyloseq e R fantaxtic/ggnested, sendo classificadas a nível de filo e gênero. o gráfico de barras empilhadas apresenta os cinco gêneros mais abundantes dentre os 10 filios mais abundantes (Figura 36).

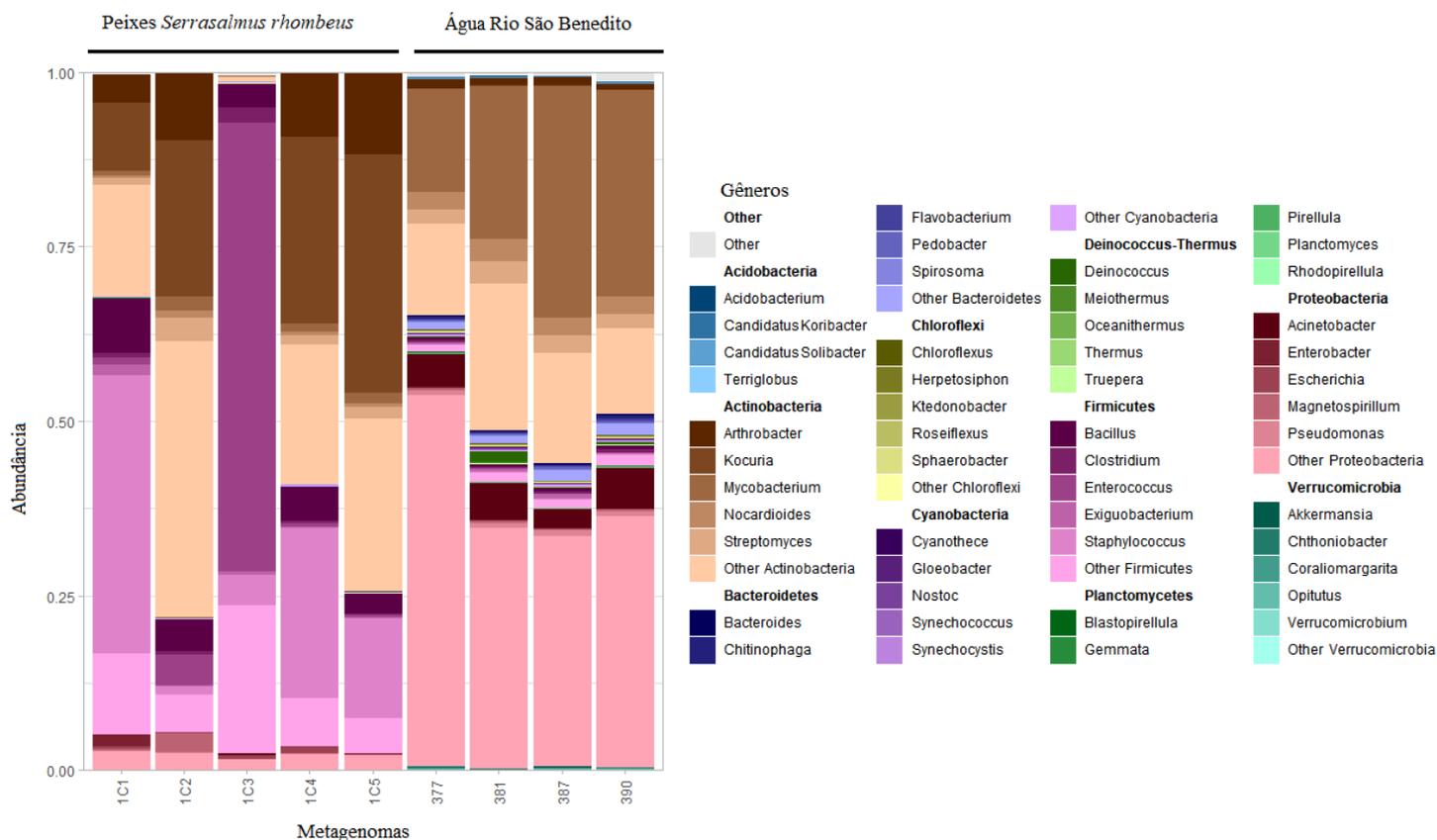


Figura 36: Gráfico de barras empilhadas apresentando os 5 gêneros mais abundantes dentro dos 10 filos mais abundantes em cada metagenoma. Gráfico de barras empilhadas feito os pacotes R Phyloseq e R fantaxtic/ggnested (McMurdie &, Holmes, 2013; Teunisse, 2022; R Core Team, 2022).

Pelos resultados apresentados na Figura 36, pode-se perceber uma diferença na distribuição dos filos em cada metagenoma. O filo Actinobacteria está abundante em todos os metagenomas, exceto no metagenoma 1C3, que está presente em menor quantidade. Os metagenomas oriundos da região ânus dos peixes (1C1, 1C2, 1C3, 1C4 e 1C5) possuem uma maior predominância do filo Firmicutes. Também há a presença de outros filos, como o Proteobacteria, em menor proporção. Já para os metagenomas oriundos de água do Rio São Benedito (377, 381, 387 e 390) o filo Proteobacteria está bastante abundante. Há a presença em menor proporção dos filos Firmicutes, Bacteroidetes, Cyanobacteria e Verrucomicrobia.

A proporção do filo Proteobacteria teve uma grande variação em relação aos metagenomas de água do Rio São Benedito, tendo uma maior quantidade de representantes do que nos metagenomas oriundos da região ânus dos peixes. Os

metagenomas oriundos de água do Rio São Benedito 381 e 387 apresentaram uma quantidade maior do filo Actinobacteria do que os metagenomas de água do Rio São Benedito 377 e 390, mas continuam seguindo um padrão. Já para os metagenomas oriundos da região ânus dos peixes, pode-se observar que há uma discrepância no metagenoma 1C3, pois este apresenta um número muito maior de bactérias pertencentes ao filo Firmicutes, do que os outros metagenomas oriundos da região ânus dos peixes e também apresentou um número baixo de bactérias do filo Actinobacteria, mostrando que este metagenoma possui uma comunidade microbiana com proporções diferentes das outras amostras oriundas de peixes. Diferente da comunidade microbiana encontrada nos metagenomas de água do Rio São Benedito, que tem uma proporção semelhante de bactérias contidas nos filios, os metagenomas oriundo da região ânus dos peixes, mostram uma diferença nas proporções dos filios Actinobacteria e Firmicutes. As amostras 1C2, 1C4 e 1C5 possuem uma quantidade muito maior de bactérias do filo Actinobacteria. Entretanto, as amostras 1C1 e 1C3 apresentam uma quantidade de bactérias maior no filo Firmicutes. Já para o filo Proteobacteria, a proporção manteve-se equilibrada nos metagenomas da região ânus dos peixes.

Em relação aos gêneros, um dos objetivos desta tese foi verificar a presença do gênero *Aeromonas* nas amostras oriundas do peixe *S. rhombeus* e nas amostras de água do Rio São Benedito. Foi verificado pelo uso dos dados metagenômicos que as amostras oriundas de peixes apresentaram de 3-20 leituras, sendo 1C1 (9), 1C2 (20), 1C3 (4), 1C4 (11) e 1C5 (3). Já para as amostras de água foi possível encontrar de 7-26, sendo: 377 (17), 381 (14), 387 (7) e 390 (26). Estas sequências estão representadas no gráfico de barras na categoria do filo: “Outras Proteobacterias”. Sendo assim, não foi possível detectar uma grande quantidade do gênero pela técnica de sequenciamento metagenômico *shotgun*. Ao tentar isolar as bactérias do gênero *Aeromonas* em meio seletivo GSP, não foi possível encontrar colônias com as determinadas características. Mostrando que há menos abundância deste gênero neste ambiente de estudo.

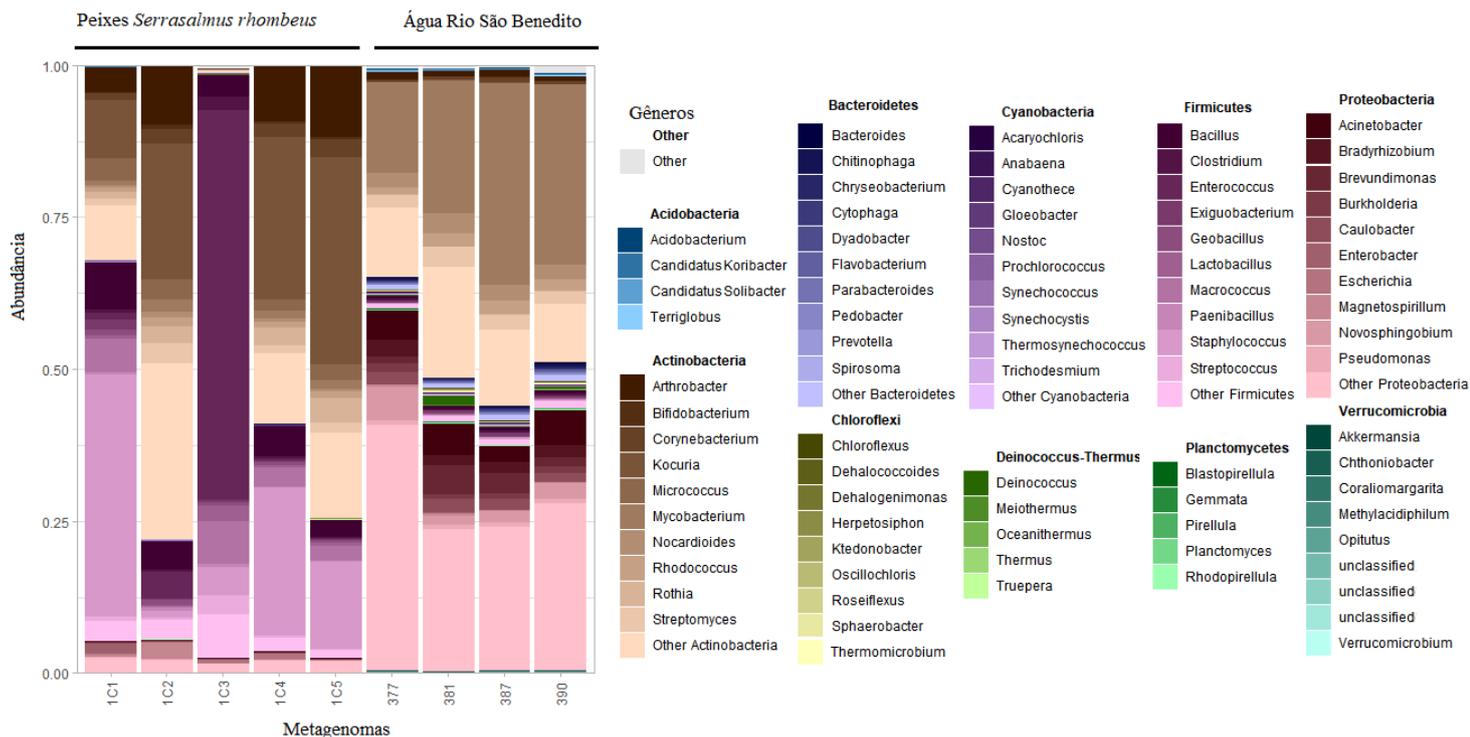


Figura 37: Gráfico de barras empilhadas apresentando os 10 gêneros mais abundantes dentro dos 10 filós mais abundantes em cada metagenoma. Gráfico de barras empilhadas feito os pacotes R Phyloseq e R fantaxtic/ggnested (McMurdie &, Holmes, 2013; Teunisse, 2022; R Core Team, 2022).

O gráfico apresentado na Figura 37, mostra os 10 gêneros mais abundantes dentro dos 10 filós mais abundantes. Os metagenomas oriundos da região ânus dos peixes, apresentaram diversos gêneros, como: *Arthrobacter*, *Kocuria*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*. Os gêneros mais abundantes nos metagenomas da região ânus dos peixes foram: *Kocuria* e *Staphylococcus* para os metagenomas 1C1, 1C4 e 1C5. Para o 1C2 foram os gêneros *Kocuria* e *Arthrobacter*. Já o metagenoma 1C3 foi o mais diferente, tendo os gêneros *Enterococcus* e *Macrococcus* como os mais abundantes, o gênero *Staphylococcus* ficou em terceiro lugar e o gênero *Kocuria* ficou em 200°. O gênero *Bacillus* está igualmente representado em todos os metagenomas da região ânus dos peixes. O gênero *Arthrobacter* está representado em todos os metagenomas, estando em segundo lugar para o metagenoma 1C2, terceiro lugar para os metagenomas 1C4 e 1C5, em quinto para o metagenoma 1C1. Já para o metagenoma 1C3, está representado na posição 44°. Para o metagenoma 1C3, o gênero *Macrococcus* ficou em segundo lugar em relação à abundância. Já para os demais ficou em quarto para o 1C1, em quinto para o 1C4 e em 7° para o 1C5, já para o 1C2 ficou em 62°. O gênero *Micrococcus* está

distribuído de forma similar nos metagenomas 1C1, 1C2, 1C4 e 1C5, sendo em 6º lugar para o metagenoma 1C1 e 8º lugar nos metagenomas 1C2, 1C4 e 1C5. Já para o metagenoma 1C3, este gênero não foi representado. O gênero *Enterococcus* foi bem representado nos metagenomas 1C3 estando em primeiro lugar, para o metagenoma 1C2 ficou na 4º posição, no metagenoma 1C1 ficou na posição 11º, já nos metagenoma 1C4 e 1C5, o gênero está nas posições 22º e 35º, respectivamente.

Em relação ao gênero, as amostras de água apresentaram uma grande diversidade, como: *Acinetobacter*, *Bradyrhizobium*, *Brevundimonas*, *Caulobacter*, *Mycobacterium*, *Nocardioides*, *Novosphingobium*, *Rhodococcus* e *Streptomyces*. O gênero mais abundante foi o *Mycobacterium*. Em segundo lugar, o gênero comum entre os quatro metagenomas de água do Rio São Benedito foi o *Acinetobacter*. O gênero *Streptomyces* foi o 5º mais abundante nas amostras 381,387 e 390, já para a amostra 377 foi o 8º mais abundante. Os gêneros *Nocardioides*, *Caulobacter*, *Bradyrhizobium* também estão igualmente representados nos metagenomas de água do Rio São Benedito. A distribuição dos gêneros *Brevundimonas* e *Novosphingobium* apresentou maior semelhança entre as amostras 381 e 387. O gênero *Brevundimonas* está em segundo lugar em abundância na amostra 381 e em terceiro lugar para a amostra 387. E o gênero *Novosphingobium* está em 13º para o metagenoma 381 e em 9º lugar para o metagenoma 387. Já para os metagenomas 377 e 390, há uma diferença nesta posição. O gênero *Brevundimonas* está em 20º lugar para o metagenoma 377 e na 9º posição para o metagenoma 390. O gênero *Novosphingobium* está em segundo lugar para o metagenoma 377 e 4º lugar para o metagenoma 390. Mostrando que as amostras 381 e 387 possuem mais bactérias do gênero *Brevundimonas*, já os metagenomas 377 e 390 possuem uma maior abundância de bactérias do gênero *Novosphingobium*. Pode-se perceber algumas diferenças entre os metagenomas oriundos da água do Rio São Benedito, como a amostra 377 que apresentou uma maior diferença para as demais amostras de água, possuindo uma maior quantidade de bactérias nos gêneros *Polynucleobacter* e *Erythrobacter*, estando representadas em 4º e 5º lugar para este metagenoma. O metagenoma mais próximo ao 377 foi o 390 que apresentou o gênero *Erythrobacter* em 9º. Outra diferença entre os metagenomas de água do Rio São Benedito está na amostra 381 que apresentou um grande número de bactérias

para o gênero *Conexibacter*, estando em 4º lugar em relação à abundância, e o gênero *Deinococcus* em 11º lugar.

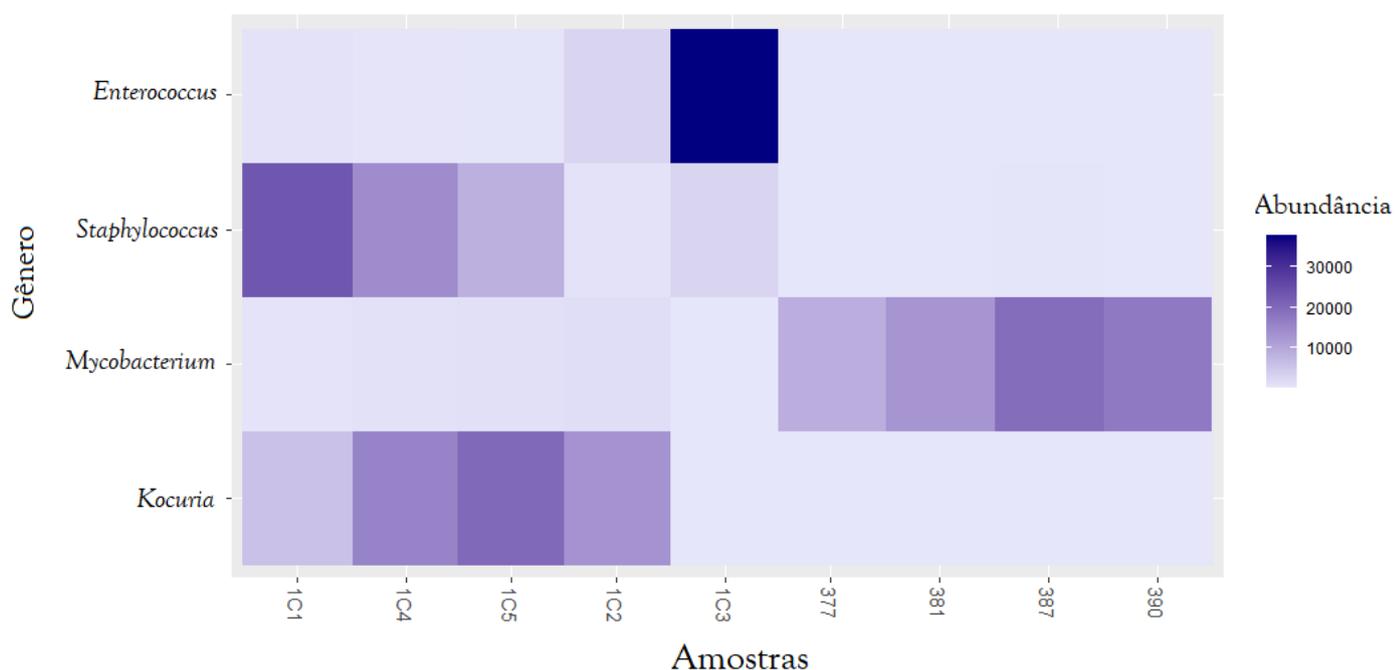


Figura 38: Mapa de calor apresentando os gêneros que representam pelo menos 20% das leituras em pelo menos um dos metagenomas. Mapa de calor feito com o pacote R Phyloseq (McMurdie &, Holmes, 2013; R Core Team, 2022).

Para uma melhor compreensão e comparação dos gêneros mais abundantes nos metagenomas, foi realizado um corte para delimitar os gêneros que representem pelo menos 20% das leituras em pelo menos um dos metagenomas (Figura 38). Como resultado pode-se verificar que as amostras de peixes (1C1, 1C2, 1C4 e 1C5) apresentam uma maior similaridade na composição da comunidade de microrganismos, tendo o gênero *Kocuria* em comum. Os metagenomas 1C1, 1C3, 1C4 e 1C5 apresentam o gênero *Staphylococcus*, apenas a 1C2 não apresentou o gênero nessas condições da análise. O metagenoma 1C3 apresenta uma discrepância dos demais metagenomas da região ânus dos peixes, tendo uma grande abundância de bactérias do gênero *Enterococcus*. Os metagenomas de água do Rio São Benedito apresentam um padrão na composição da comunidade microbiana, todas apresentam o gênero *Mycobacterium*.

As bactérias isoladas do peixe foram: *Bacillus*; *Brevibacterium*; *Kocuria*; *Microbacterium*; *Priestia*; *Serratia*; *Sphingomonas* e *Staphylococcus*. Após realizar a caracterização taxonômica dos metagenomas, foi possível verificar os gêneros isolados e

a abundância desses nos metagenomas. A comparação das estirpes isoladas dos peixes e a análise taxonômica dos metagenomas oriundos dos peixes está apresentada na Tabela 25.

Tabela 25: Análise dos principais gêneros isolados e identificados pelo MALDI-TOF na parte I do trabalho e comparação com a abundância desses gêneros encontrados através da classificação taxonômica dos metagenomas com o banco de dados RefSeq através da ferramenta MG-RAST.

Gênero identificados pelo MALDI-TOF	Abundância dos gêneros nos metagenomas				
	1C1	1C2	1C3	1C4	1C5
<i>Staphylococcus</i>	26.163	1.170	1.532	14.444	6.084
<i>Bacillus</i>	5.124	4.578	1.164	2.889	1.180
<i>Brevibacterium</i>	276	761	0	423	413
<i>Kocuria</i>	6.353	22.327	2	15.793	14.465
<i>Serratia</i>	48	24	12	18	8
<i>Sphingomonas</i>	7	13	0	10	11
<i>Microbacterium</i>	0	0	0	0	0
<i>Niallia</i>	0	0	0	0	0
<i>Priestia</i>	0	0	0	0	0

* Os gêneros *Microbacterium*, *Niallia* e *Priestia*, marcados de cinza na tabela, foram identificados pelo MALDI-TOF no isolamento realizado em bancada, porém não foram encontrados nas análises *in silico* dos metagenomas.

A alfa diversidade, utilizada para verificar a diversidade das amostras, foi calculada pelo índice Chao1, que avalia a riqueza total das amostras, e o índice de Shannon (Shannon-Weiner) que avalia a riqueza (diversidade de espécies) e abundância relativa (igualdade) das amostras. Os resultados estão apresentados na Figura 39.

O índice de diversidade observada representa o total de OTU (em nível de gênero) em cada metagenoma. As amostras de água apresentaram o número de OTUs superior a

500. Já para as amostras 1C1, 1C2, 1C4 e 1C5, todas oriundas do ânus dos peixes, o número de OTUs variou entre 400 - 500 OTUS. A amostra 1C3 foi a que apresentou o menor número de gêneros, tendo 308 OTUs.

As análises com o índice de diversidade Chao1 examina todos os táxons que possuem *singleton* e *doubleton* e faz uma estimativa dos táxons que estão nas amostras, sendo assim, levam em consideração os táxons raros. Os metagenomas oriundos de água do Rio São Benedito e os metagenomas, 1C1, 1C2 e 1C4, oriundos da região ânus dos peixes possuem um índice Chao1 de 500. Exceto o 1C3 que apresentou um valor menor de Chao1, mostrando ter menos riqueza que os demais metagenomas, já o metagenoma 1C5 foi o que apresentou um índice de Chao1 mais alto, aproximadamente 6.000, sendo assim, esse metagenoma apresenta uma grande riqueza, com muitos táxons com um ou dois representantes (*singleton* e *doubleton*).

O índice de diversidade Shannon para as amostras de água ficou em torno de 4 – 4.5, sendo mais alto do que os metagenomas oriundos da região ânus dos peixes, mostrando que os metagenomas de água do Rio São Benedito possuem uma maior diversidade de espécies bacterianas que os metagenomas da região ânus dos peixes. Os metagenomas 1C1, 1C4 e 1C5, oriundos de peixes, possuem o índice de Shannon em torno de 3. Em relação a esse grupo, o metagenoma 1C2 apresentou o índice de Shannon maior, em torno de 3.5, mostrando uma maior diversidade e uniformidade na comunidade bacteriana. Já o metagenoma 1C3 apresentou o índice de Shannon mais baixo, em torno de 1.6, apresentando uma intravariabilidade menor que os demais, tendo uma comunidade tendenciosa com menos espécies de bactérias dominantes que nos outros metagenomas de água do Rio São Benedito e os metagenomas da região ânus dos peixes, sendo assim, é menos diverso e menos uniforme. Ambientes com muita diversidade, normalmente possuem o índice de Shannon acima de 2, sendo apenas o metagenoma 1C3 com uma uniformidade baixa e pouca diversidade de acordo com esse ponto de corte. Os demais metagenomas apresentaram o índice de Shannon acima de 2, podendo ter uma maior diversidade.

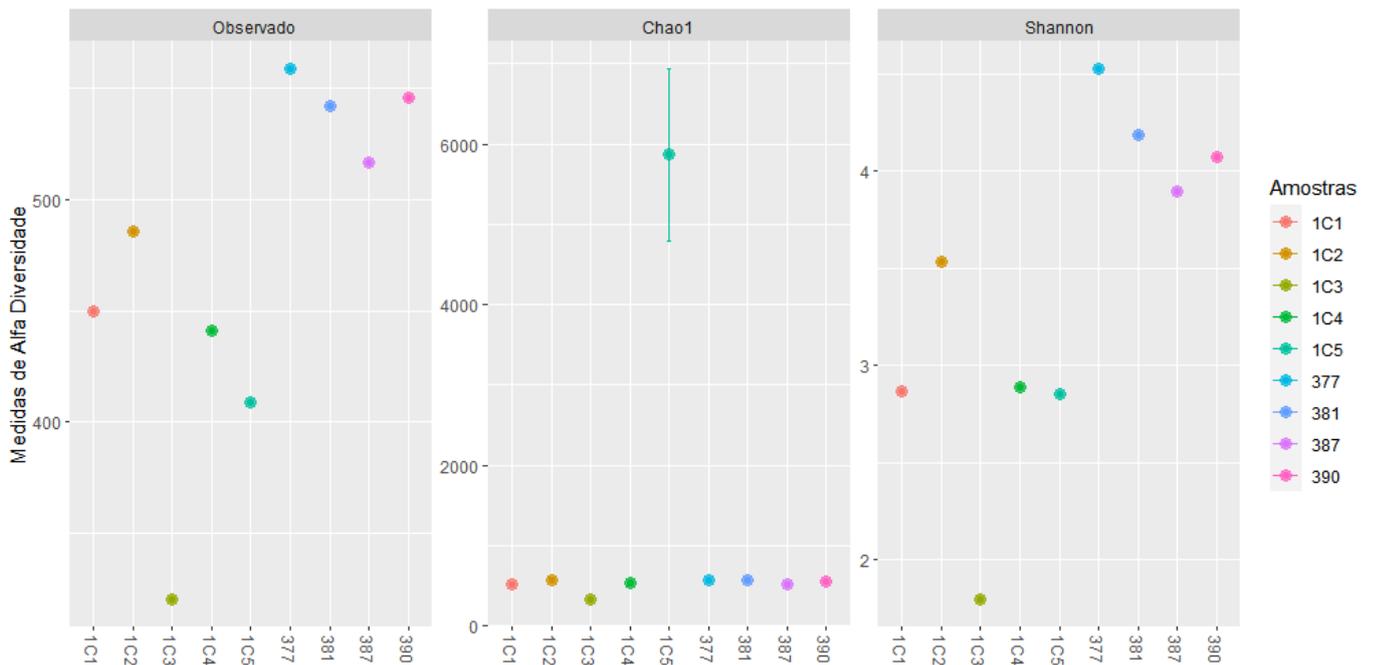


Figura 39: Gráfico representando a Alfa diversidade dos metagenomas. Através dos índices de diversidade observada, Chao1 e Shannon. Gráfico feito com a ferramenta R e pacote Phyloseq (McMurdie &, Holmes, 2013; R Core Team, 2022).

A Figura 40 apresenta os resultados da redução de dimensionalidade da matriz de distância Bray-Curtis com a abordagem de Análise de Coordenadas Principais (PcoA), a qual possibilita representar as relações entre metagenomas e consequentemente a identificação de dois *clusters*, relacionados aos metagenomas oriundos de amostras de água do Rio São Benedito e oriundos da região ânus dos peixes da espécie *S. rhombeus*. A topologia do gráfico apresenta dois grandes grupos, o grupo dos metagenomas 1C1, 1C2, 1C3, 1C4 e 1C5 que são os metagenomas oriundos da região ânus dos peixes da espécie *Serrasalmus rhombeus* e o grupo dos metagenomas 377, 381, 387 e 390 que são os metagenomas oriundos das amostras de água do Rio São Benedito. O gráfico apresenta duas dimensões que mostram 86,4% da variação total entre os metagenomas.

Através dessa análise, pode-se verificar que a intravariabilidade entre os metagenomas oriundos das amostras de água do Rio São Benedito é menor do que a intravariabilidade dos metagenomas oriundos da região Ânus dos peixes da espécie *Serrasalmus rhombeus*, sendo assim, os metagenomas dentro do grupo dos peixes são mais diferentes, apresentando uma comunidade diferente. Já os metagenomas oriundos da água do Rio São Benedito apresentam uma comunidade mais semelhante. Dentre os metagenomas oriundos da região Ânus dos peixes da espécie *Serrasalmus rhombeus*, o metagenoma 1C3 apresentou ser o mais dissimilar dos demais metagenomas deste grupo. Já a Intervariabilidade é grande entre os dois grupos (Água e Peixes), mostrando que a comunidade microbiana presente é diferente.

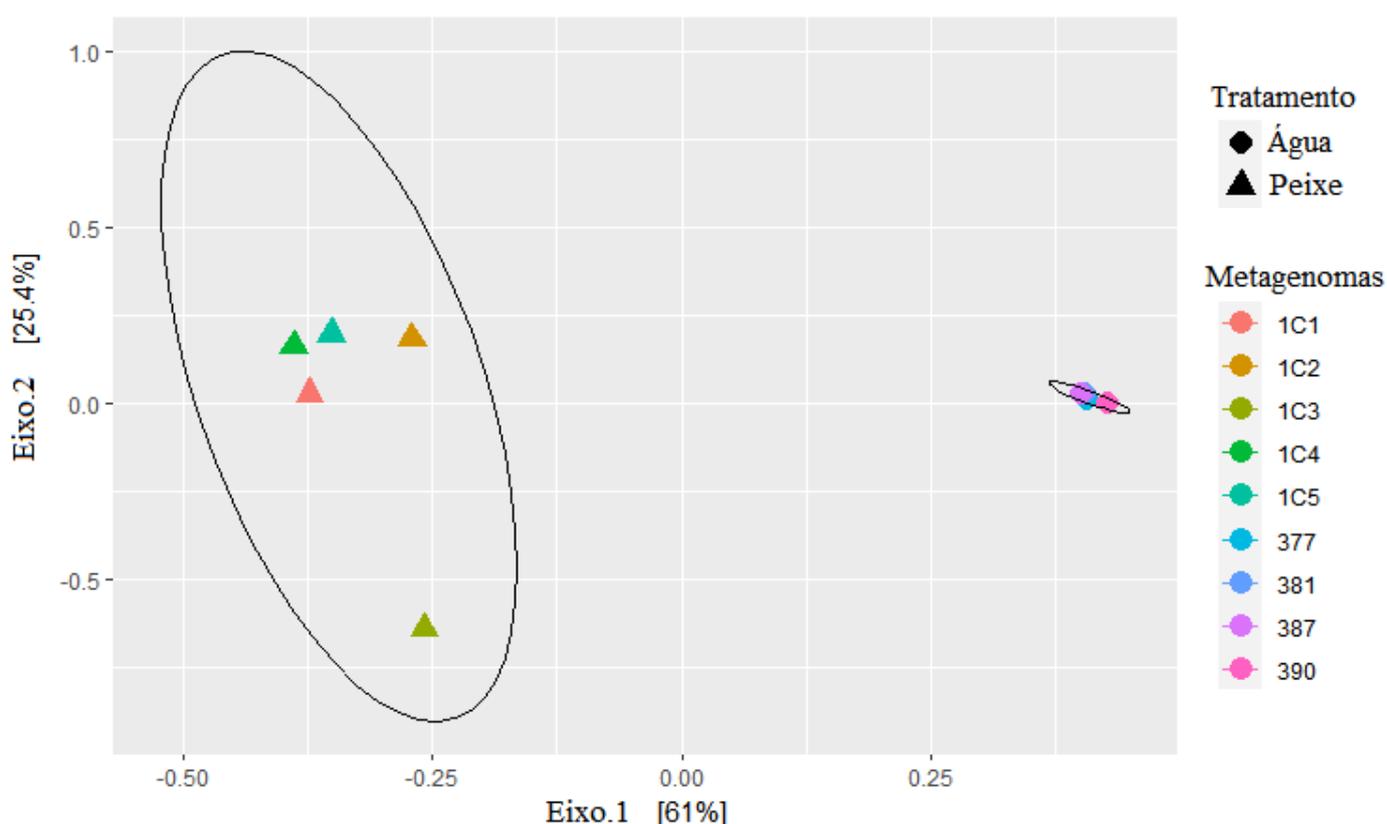


Figura 40: Ordenação da análise de coordenadas principais (PcoA) de uma matriz de dissimilaridade calculada pela distância de Bray-Curtis. Gráfico feito com a linguagem de programação R e o pacote Phyloseq (McMurdie &, Holmes, 2013; R Core Team, 2022).

Para testar se o grupo dos metagenomas oriundos da região ânus dos peixes da espécie *S. rhombeus* e o grupo dos metagenomas oriundos das amostras de água do Rio São Benedito, são significativamente diferentes, de acordo com o teste Permanova para Adonis, com o pacote R Vegan foi empregado. Tendo como resultado o valor de 0,007,

sendo significativo e mostrando que existe diferença significativa entre os dois grupos (metagenomas oriundos de amostras de água do Rio São Benedito e os metagenomas oriundos da região ânus dos peixes da espécie *S. rhombeus*).

Neste teste é possível afirmar que a intravariabilidade (comparação entre as amostras do grupo) é menor que a intervariabilidade que é a comparação entre os dois grupos dos metagenomas (oriundos da água do Rio São Benedito X os metagenomas da região ânus dos peixes), também pode-se concluir que a amostragem dos diferentes ambientes foi significativa.

A Figura 41 apresenta a beta diversidade representada por *boxplot*, mostrando o índice de dissimilaridade calculado pela distância Bray-curtis. Por meio dessa análise pode-se observar que o grupo dos metagenomas oriundos das amostras de água Rio São Benedito possuem uma variabilidade menor, sendo mais semelhantes entre si. Já o grupo dos metagenomas oriundos da região ânus dos peixes da espécie *S. rhombeus* possuem uma maior variabilidade, tendo uma comunidade microbiana mais diferente. Ambos os grupos são assimétricos positivos, pois as medianas estão mais próximas ao primeiro quartil. Por meio da distância Bray-curtis, pode-se observar que os metagenomas do grupo da região ânus dos peixes são muito dissimilares, podendo variar em torno de 0.2 – 0.8 de diversidade. Já os metagenomas oriundos das amostras de água do Rio São Benedito ficam em torno de 0.2 – 0.3 de diversidade Bray-curtis.

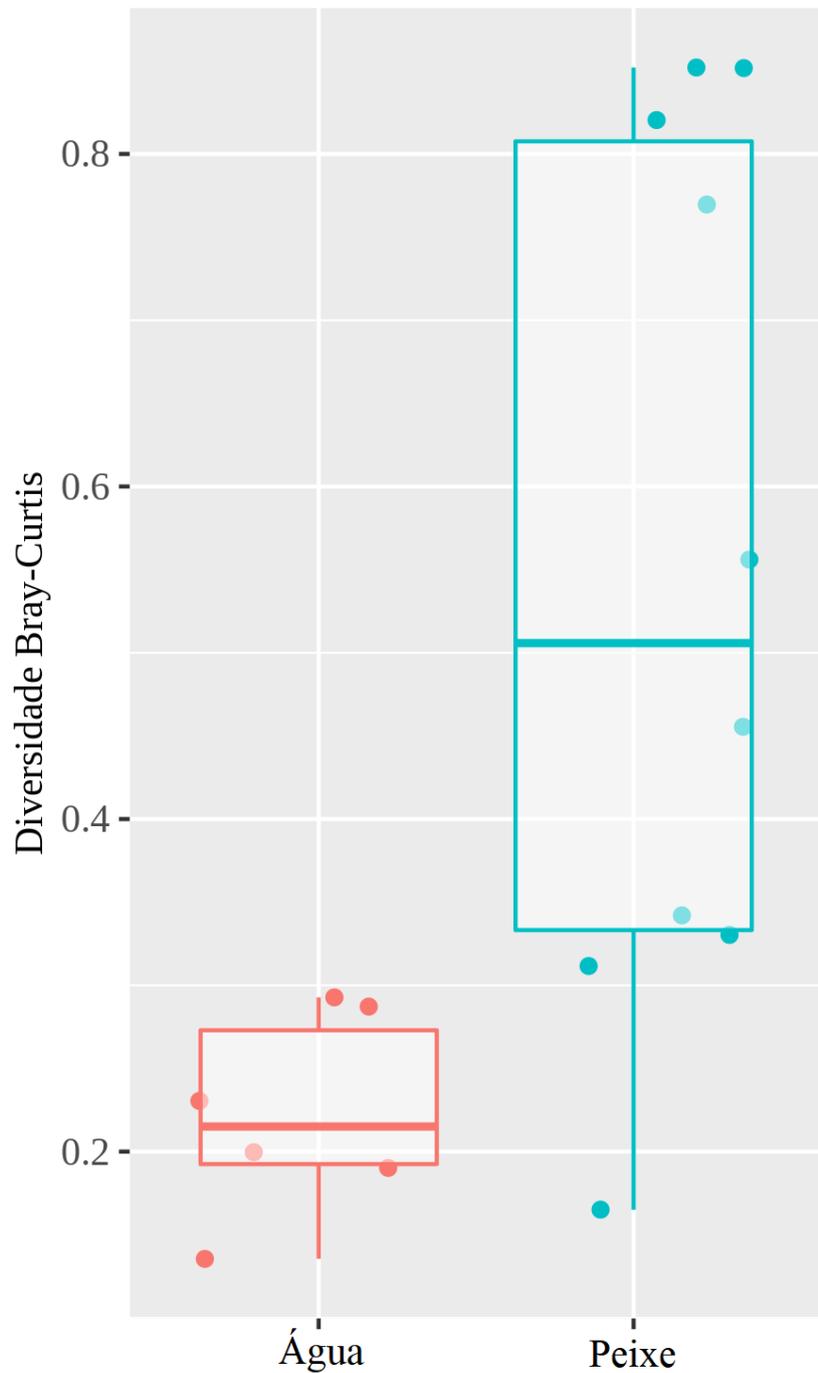


Figura 41: Gráfico *boxplot* contendo a beta diversidade comparando os metagenomas oriundos da região ânus dos peixes e os metagenomas oriundos da água do Rio São Benedito. Gráfico feito com a linguagem de programação R e o pacote Phyloseq (McMurdie &, Holmes, 2013; R Core Team, 2022).

4.3.2.4 Avaliação funcional de metagenomas e anotação das montagens dos contigs

A avaliação funcional foi realizada por meio de atribuições de ortologia e mapeamento de vias metabólicas realizadas pelas ferramentas KAAS e KEGG *Mapper Reconstruction*, os resultados estão apresentados na Tabela 26 e Figuras 42 e 43.

Tabela 26: Tabela com o total de genes ortólogos anotados para cada categoria de vias metabólicas, dados oriundos da ferramenta KAAS e KEGG *Mapper Reconstruction*.

Metagenom a	Categoria					
	Metabolism o	Processamento de Informação Genética	Processamento de Informações Ambientais	Processos Celulares	Sistemas Organismos	Doenças Humanas
1C1	803	74	72	31	20	51
1C2	1.537	119	109	54	37	58
1C3	1.051	96	110	66	7	40
1C4	1.079	107	60	29	23	68
1C5	783	50	34	27	19	32
377	8	1	0	2	1	1
381	127	12	9	5	3	3
387	88	2	7	5	3	8
390	66	2	4	5	1	4

Ao observar as certas vias metabólicas, como: na categoria de processamento ambiental, e nas subcategorias de biodegradação de xenobióticos e biossíntese de glicanos, que são super representados em microrganismos oriundos de ambientes poluídos, pode-se estimar o impacto causado pela interferência do homem na natureza. Neste estudo, o total de genes envolvidos nessas categorias para os metagenomas oriundos da região ânus dos peixes ficou em torno de 66 - 162. Sendo os metagenomas 1C2 e 1C3 com os valores mais altos. Já para os metagenomas oriundos de água do Rio São Benedito, os valores ficaram em torno de 5 - 14, sendo o metagenoma 381 o que contém a maior quantidade de genes envolvidos nessas categorias. O metagenoma 377 não apresentou genes para essas categorias.

Em relação à categoria de “Resistência a medicamentos: antimicrobianos”, houve anotação para todos os metagenomas oriundos da região ânus dos peixes e apenas para

um metagenoma de água do Rio São Benedito (387), a Figura 42 apresenta a quantidade de genes anotados para cada metagenoma. Os metagenomas oriundos da região ânus dos peixes 1C1, 1C2, 1C3 e 1C4 apresentaram genes relacionados à resistência para beta-lactâmicos, vancomicina e a um peptídeo antimicrobiano catiônico (CAMP). Já o Metagenoma 1C5 apresentou genes de resistência a beta-lactâmicos e vancomicina. Para os metagenomas oriundos de água Rio São Benedito, apenas o 387 apresentou um gene relacionado à resistência para beta-lactâmico. Mostrando que no ambiente peixe existem mais organismos capazes de resistir aos antimicrobianos.

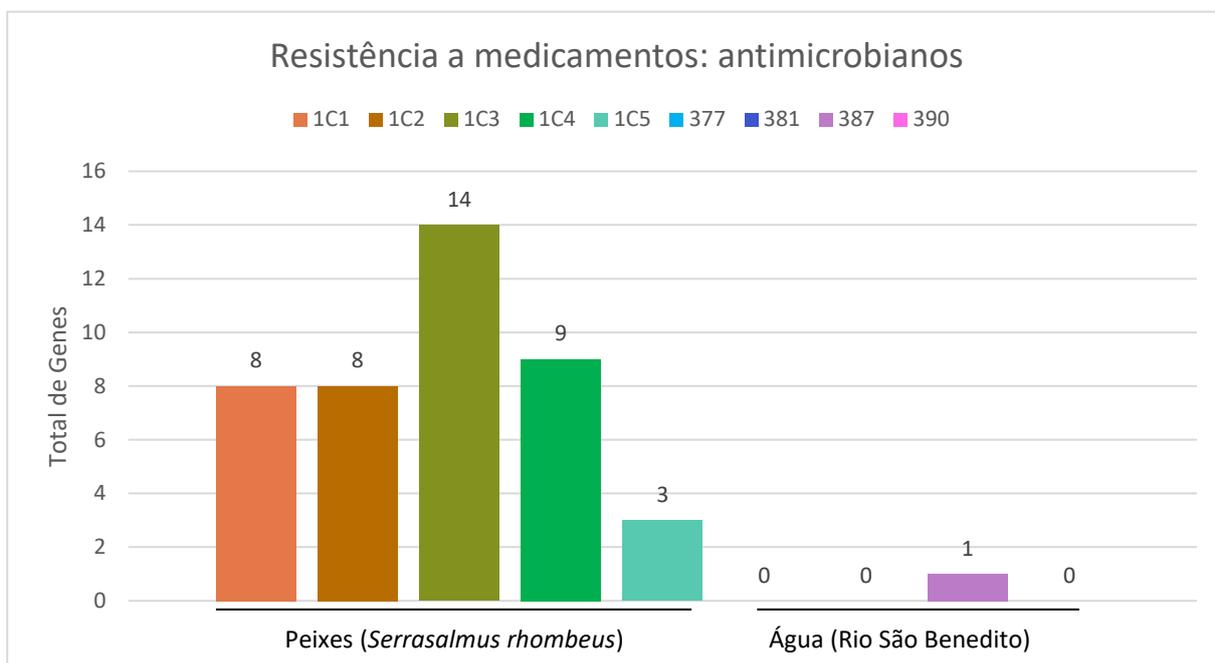


Figura 42: Gráficos de barras apresentando o total de genes relacionados a resistência a antimicrobianos, anotados pela ferramenta KAAS e KEGG *Mapper Reconstruction*,

Os sistemas da subcategoria de “Biossíntese de metabólitos secundários” foram avaliados e apresentados na Figura 43. Apenas o metagenoma 381 dentre as amostras de água obteve sequências relacionadas a algum dos 19 sistemas analisados para a subcategoria. Sendo anotados nos sistemas de “Biossíntese de: betalaína”; “fenilpropanoide”; “novobiocina” e “prodigiosina”. Três sistemas foram anotados para todas as amostras de peixes, os quais são relacionados à “Biossíntese de: monobactâmico”; “novobiocina” e “prodigiosina”. Os sistemas de “Biossíntese de: acarbose e validamicina”; “betalaína”; “fenilpropanoide” e “neomicina, canamicina e gentamicina” foram anotados em apenas um dos metagenomas.

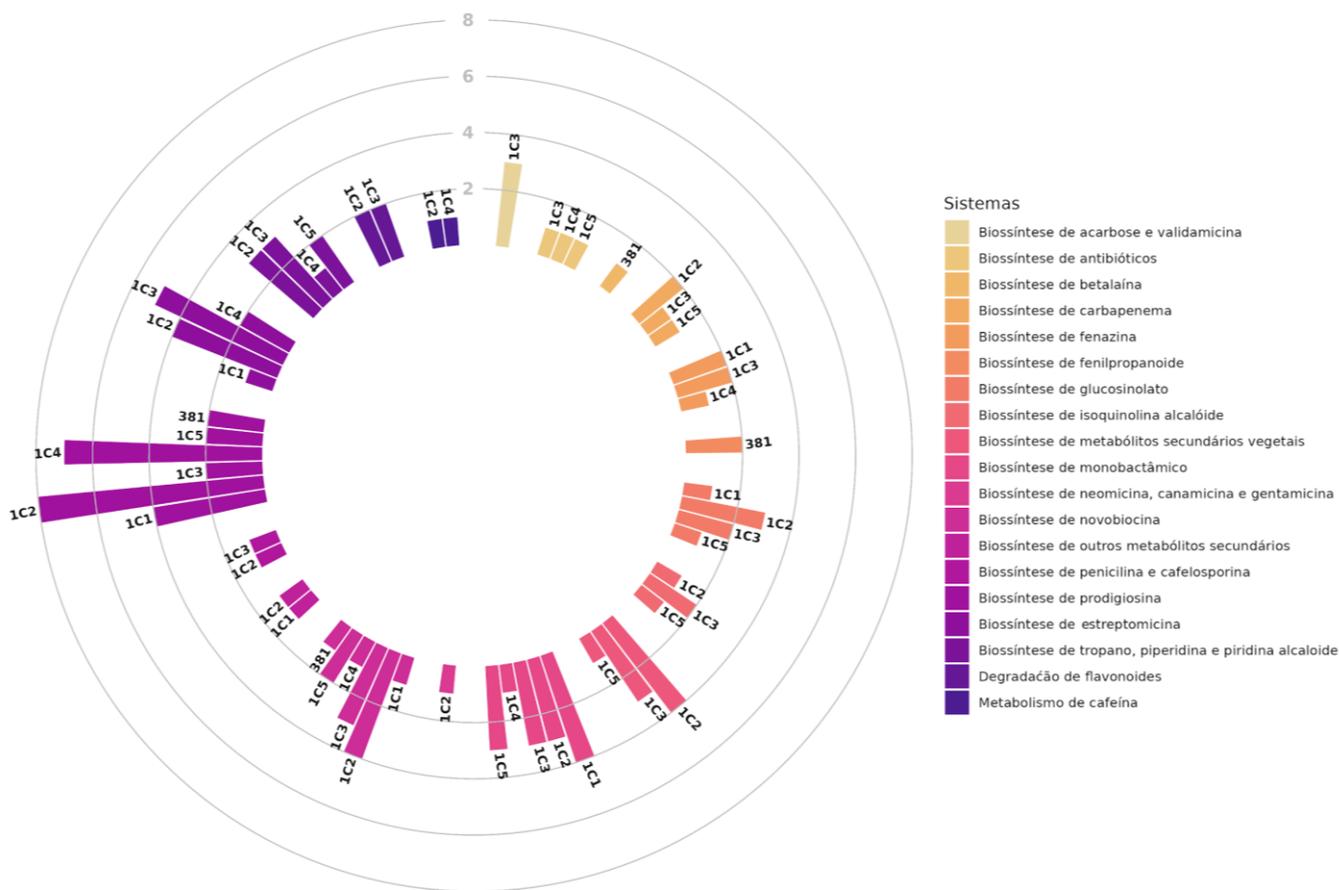


Figura 43: Gráficos de barras empilhadas com as vias de biossíntese de substâncias antimicrobianas.

Por meio da análise com o KEGG, foram anotadas diversas vias metabólicas relacionadas a produção de substâncias antimicrobianas dentro da subcategoria de “Biossíntese de metabólitos secundários”. Em relação a produção de antibióticos, foi possível encontrar 9 vias: produção de antibióticos (1C3, 1C4 e 1C5); biossíntese de acarbose e validamicina (1C3); produção de carbapenema (1C2, 1C3 e 1C5); biossíntese de fenazila (1C1, 1C3 e 1C4); biossíntese de monobactâmicos (1C1-1C5); biossíntese de neomicina, canamicina e gentamicina (1C2); biossíntese da novobiocina (1C1-1C5, 381); biossíntese de penicilina e cefalosporina (1C1 e 1C2) e biossíntese de estreptomicina (1C1, 1C2, 1C3 e 1C4). Assim como foram anotadas as vias de produção dos corantes: biossíntese de betalaína (381) e biossíntese de prodigiosina (1C1-1C5, 381).

A ferramenta PlasmidFinder encontrou uma sequência de plasmídeo para o metagenoma 1C3 (NODE_121). Por meio do BLASTn do NCBI foi possível verificar que essa sequência possui 100% de identidade, 100% de cobertura e *e-value* de 0.0 com a sequência de plasmídeo QY182 DNA do organismo *Enterococcus mundtii* QU 25. O plasmídeo QY182 possui o tamanho de 181.920 pb e o conteúdo G+C de 36,2%. Pela classificação taxonômica, a ferramenta MG-RAST anotou sequências de plasmídeos e estas estão apresentadas na Tabela 27. Nesta análise não foram encontradas sequências de plasmídeos para os metagenomas 1C3, 387 e 390.

Tabela 27: Resultado dos plasmídeos anotados pela classificação taxonômica da ferramenta MG-RAST

Plasmídeo	1C1	1C2	1C4	1C5	377	381
Plasmídeo ColE1	0	0	1	0	0	0
Plasmídeo Collb-P9	0	0	4	0	0	0
Plasmídeo F	0	0	1	0	0	0
Plasmídeo pAL5000	1	65	29	21	0	0
Plasmídeo pLB1	0	5	0	0	1	1

* Em cinza está destacado o plasmídeo pAL 5000, este foi encontrado em maior quantidade e em um número maior de metagenomas

A ferramenta ABRicate, utilizada para verificar genes de resistência e fatores de virulência, anotou genes apenas para os metagenomas 1C1 e 1C3, os resultados estão apresentados na Tabela 28.

Tabela 28: Resultado da ferramenta ABRicate com os bancos de dados ARG-ANNOT, CARD, Ecoli_VF, EcoOH, MEGARES, NCBI, PlasmidFinder, Resfinder e VFDB.

Metagenoma	Banco de dados	Sequencia	Inicio	Fim	Gene	Cobertura	Identidade	Acesso	Produto
1C1	plasmid finder	NODE_22 length_1647	298	1221	<i>rep13_6_rep</i> (<i>pLNU1</i>)	99.89	81.95	AM184099	<i>rep13_6_rep</i> (pLNU1)_AM184099
1C3	Argannot	NODE_237 length_1371	55	1107	(<i>Gly</i>) <i>vanC4</i>	100	97.72	EU151752:2 9-1081	(<i>Gly</i>) <i>vanC4</i>
	Megares	NODE_237 length_1371	55	1371	<i>VANC</i>	81.2	98.1	MEG_7377	Drugs:Glycopeptides:VanC-type_resistance_protein:VANC
	NCBI	NODE_237 length_1371	55	1107	<i>vanC2/3</i>	100	97.72	NG_048346. 1	D-alanine--D-serine ligase VanC2/3
	Plasmid finder	NODE_121 length_1667	126	1625	<i>repUS28_repE</i> (<i>pQY182</i>)	100	90.53	AP013037	<i>repUS28_repE</i> (pQY182) AP013037
	Resfinder	NODE_237 length_1371	55	1371	<i>vanC4XY_1</i>	81.2	98.1	EU151752	VanC4XY

A sequência encontrada para o metagenoma 1C1 pela ferramenta PlasmidFinder, possui identidade de 81,95% com o gene *rep13_6_rep* do plasmídeo pLNU1. O gene *rep* codifica a proteína iniciadora de replicação. Na literatura esse plasmídeo contém o gene *lnu(A)* que codifica uma lincosamida nucleotidiltransferase, que confere resistência à lincosamida (Lüthje, von Köckritz-Blickwede & Schwarz, 2007). No UniProt a sequência teve 79,4% de identidade com a sequência do gene *HGA08_30690* da bactéria *Nocardia vermiculata*, que foi anotado com a função de codificar uma proteína de replicação de plasmídeos Gram-positivos do tipo 1 (Acesso do UniProt: A0A846YCL2). Já para o metagenoma 1C3, as sequências encontradas nos bancos de dados com o uso da ferramenta ABRicate estão relacionadas a presença de resistência ao antibiótico vancomicina.

4.3.2.5 Mineração de genes relativos a substâncias antimicrobianas em metagenomas

A ferramenta AntiSMASH anotou *clusters* apenas para os metagenomas 1C2 e 1C4. Os resultados estão apresentados na Tabela 29.

Tabela 29: Resultado do AntiSMASH e BLAST com a base de dados UniProt para os genes de biossíntese central que foram encontrados nos metagenomas.

Metagenoma	AntiSMASH Cluster	Entrada/Acesso	UniProt/ BLAST		
			Proteína/Gene	Identidade	Organismo
1C2	NI-sideróforo	Trembl/A0A0H2KL19	Lisina N-aciltransferase MbtK, proteína K da micobactina sintase/ <i>FB00_13325</i>	89,80%	<i>Cellulosimicrobium funkei</i>
		Trembl/A0A0Q5AK36	Lactococcin 972 família bacteriocina/ <i>ASF42_07335</i>	41,10%	<i>Rathayibacter sp. Leaf294</i>
	Terpeno (Biossíntese)	Trembl/A0A5N8XF78	Esqualeno sintase / <i>FB00_02900</i>	93,80%	<i>Cellulosimicrobium funkei</i>
	Terpeno (Adicional)	Trembl/A0A0H2L6Z3	UDP-glucose 4-epimerase/ <i>FB00_02895</i>	88,60%	<i>Cellulosimicrobium funkei</i>
1C4	NI-sideróforo	Trembl/B2GG14	Proteína de biossíntese putativa de sideróforo/ <i>KRH_10950</i>	98,80%	<i>Kocuria rhizophila (strain ATCC 9341 / DSM 348 / NBRC 103217 / DC2201)</i>

* Em cinza está destacado o *cluster* de produção de bacteriocina.

Para o metagenoma 1C2 foram anotados três *clusters*. O primeiro foi o NI-sideróforo, que contém um gene biossintético central, que ao ser analisado pela ferramenta BLAST do UniProt resultou em um gene relacionado à produção de micobactina, que é um sideróforo descrito em micobactérias. O *cluster* de terpeno anotou um gene de biossíntese central e outro gene biossintético-adicional. Por análises do BLAST com a base de dados do UniProt, foi possível verificar que estes genes estão relacionados com a síntese de esqualeno (a qual catalisa a redução da farnesil difosfato, posteriormente originando o esqualeno, que é convertido em vários esteróis), carotenóides (pigmentos isoprenóides) e fitoeno (intermediário de 40 carbonos na biossíntese de carotenóides).

No *cluster RiPP-like* foi encontrado um gene da biossíntese central e um gene classificado como “Outros Genes” (Figura 44). Os genes anotados no *cluster* de *Ripp-like* foram traduzidos e as proteínas foram analisadas nas ferramentas BLAST do NCBI e BLAST do UniProt. A análise do gene de biossíntese de *Ripp-like* no BLASTp do NCBI resultou em 100% de identidade, 100% de cobertura e com *e-value* de 3e-64 com a sequência da bacteriocina da família lactococina 972 (ID: WP_086149405.1) oriunda da bactéria do gênero *Cellulosimicrobium*; e no BLAST do UniProt, resultou em uma bacteriocina lactococina oriunda da bactéria *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LMG 2130 (Holo, Nilssen & Nes, 1991).

Já o gene anotado como “Outros genes” na análise do BLAST do NCBI resultou em 100% cobertura, 99,72% de identidade e 0.0 de *e-value* com uma proteína hipotética (ID: WP_043656583.1), oriunda da bactéria do gênero *Cellulosimicrobium*. Já no BLAST do UniProt, esta proteína teve 99.6% de identidade como a proteína contendo o domínio FtsX e gene *IU11_07460* (UniProt/Trembl: A0A085LFZ5) oriunda da bactéria *Cellulosimicrobium* sp. A proteína transmembrana que contém o domínio extracelular FtsX está relacionada a transporte e resistência aos antibióticos (Crawford *et al.*, 2011).

Após a análise dos genes/proteínas, os mesmos foram buscados na anotação do PROKKA para verificar quais outros genes estavam próximos, analisando os *contigs* ao lado do *contig* que contém os genes de interesse. Os genes anotados pelo AntiSMASH para o *cluster RiPP-like* estão representados na Figura 44.

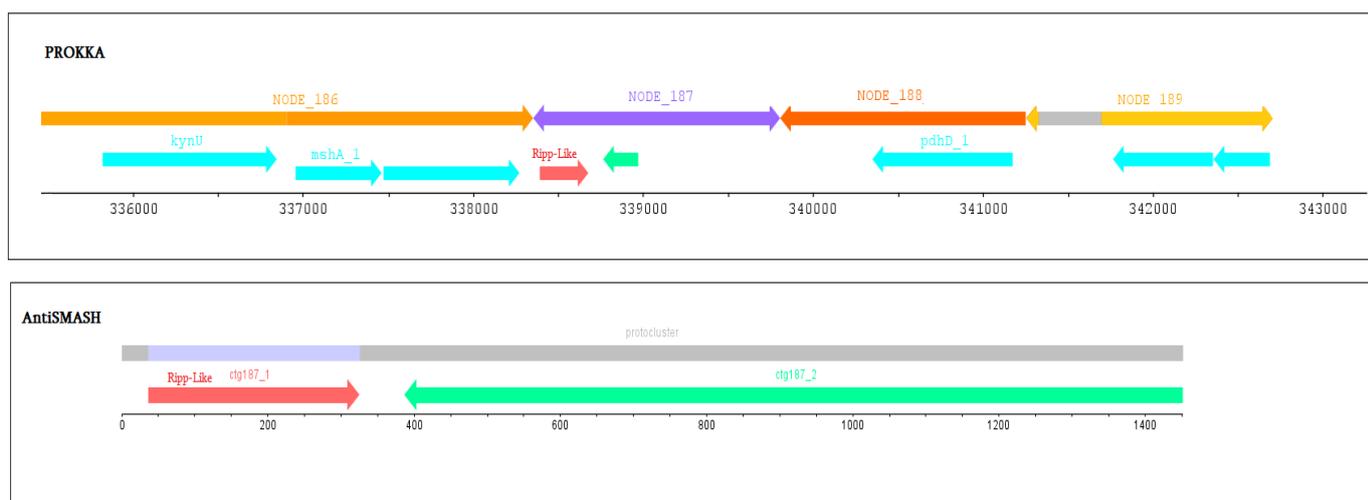


Figura 44: Na primeira linha, cada cor representa os *contigs* anotados pela ferramenta PROKKA. No *contig* Roxo (NODE_187) foi identificado o *cluster* gênico para o RiPP-like (outro produto peptídico sintetizado por ribossomo e modificado pós-tradução (RiPP) não especificado) anotado pela ferramenta AntiSMASH. Em vermelho está representado o gene de biossíntese central de produção da bacteriocina da família lactococina 972. O gene, representado pela cor verde, foi classificado como “Outros Genes”.

Já para o metagenoma 1C4 foi anotado apenas um *cluster* de NI-sideróforo, que contém um gene biossintético central. Este foi analisado no BLAST do UniProt e resultou em uma proteína de produção de sideróforo, possuindo o domínio N-terminal e C-terminal do sideróforo aerobactina.

A busca por substâncias antimicrobianas também foi realizada pela ferramenta BLAST contra os bancos de dados de bacteriocinas. A qual foi possível encontrar 14 sequências relacionadas com a produção de substâncias antimicrobianas para as amostras oriundas do peixe *S. rhombeus* (Tabela 30). Já para as amostras oriundas de água, pode-se encontrar três sequências para a produção de substâncias antimicrobianas (Tabela 31). As sequências encontradas são responsáveis pela produção das bacteriocinas, zoocina A e linocina M18. Apenas o metagenoma 1C4 apresentou uma sequência correspondente a produção da bacteriocina closticina.

Tabela 30: Resultado do BLASTp entre as amostras oriundas de peixes da espécie *Serrasalmus rhombeus* e os bancos de dados de substâncias antimicrobianas. Resultados dos bancos de dados BACTIBASE e BAGEL classe III.

Amostra	Sequência de consulta	Sequência DB	% identidade	Alinhamento	mismatches	gap opens	q. start	q. end	s. start	s. end	e-value	bit score	
1C1	NODE_3469	BAC137	Linocin M18	53.763	93	43	0	280	2	69	161	2.10e-31	102
	NODE_5786	BAC137	Linocin M18	50.000	74	37	0	1	222	25	98	3.37e-17	64.7
	NODE_6308	BAC198	Zoocin A	37.179	78	42	2	217	2	38	114	4.60e-11	47.8
	NODE_7178	BAC198	Zoocin A	44.776	67	33	1	203	3	75	137	7.40e-12	49.7
1C2	NODE_2033	BAC137	Linocin M18	57.466	221	94	0	668	6	15	235	1.25e-82	239
	NODE_4967	BAC198	Zoocin A	38.384	99	50	3	121	396	19	113	3.90e-13	56.2
1C3	NODE_164	BAC198	Zoocin A	37.607	117	60	3	908	7	3	113	6.20e-15	65.9
	NODE_1211	BAC198	Zoocin A	35.897	117	59	4	75	404	6	113	2.11e-12	56.2
	NODE_1693	BAC198	Zoocin A	41.905	105	46	3	295	2	3	99	1.76e-16	66.6
	NODE_3495*	BAC198	Zoocin A	44.444	54	30	0	31	192	60	113	4.92e-11	48.9
1C4	NODE_1421	BAC137	Linocin M18	62.428	173	65	0	563	45	81	253	1.25e-77	224
	NODE_3115	BAC198	Zoocin A	37.500	80	41	3	247	11	54	125	6.50e-12	52.0
	NODE_4257	BAC198	Zoocin A	49.020	51	25	1	308	156	63	112	6.70e-12	51.2
	NODE_1978**	Clostin_574	UNIPROT Q8GCU9_CLO TY	41.935	124	55	5	1	345	193	308	1.83e-20	78.2
1C5	NODE_671	BAC137	Linocin M18	60.140	143	57	0	56	137	111	253	1.77e-59	178

* Apenas no banco de dados Bactibase

** Apenas no banco de dados BAGEL Classe III

Tabela 31: Resultado do BLASTp entre as amostras oriundas da água do Rio São Benedito e os bancos de dados de substâncias antimicrobianas. Resultados dos bancos de dados BACTIBASE e BAGEL classe III.

Amostras	Sequência de consulta	Sequência DB	% identidade	Alinhamento	Mismatches	gap opens	q. start	q. end	s. start	s. end	e-value	bit score	
377													
				Não houve hit									
381		Linocin											
	NODE_2033	BAC137	M18	57.466	221	94	0	668	6	15	235	1.25e-82	239
	NODE_4967*	BAC198	Zoocin A	38.384	99	50	3	21	396	19	113	3.90e-13	56.2
387													
				Não houve hit									
390		Linocin											
	NODE_972	BAC137	M18	69.048	84	25	1	249	1	164	247	3.05e-40	125

* Apenas no banco de dados Bactibase

O gráfico da Figura 45 apresenta todas as bacteriocinas encontradas para cada metagenoma.

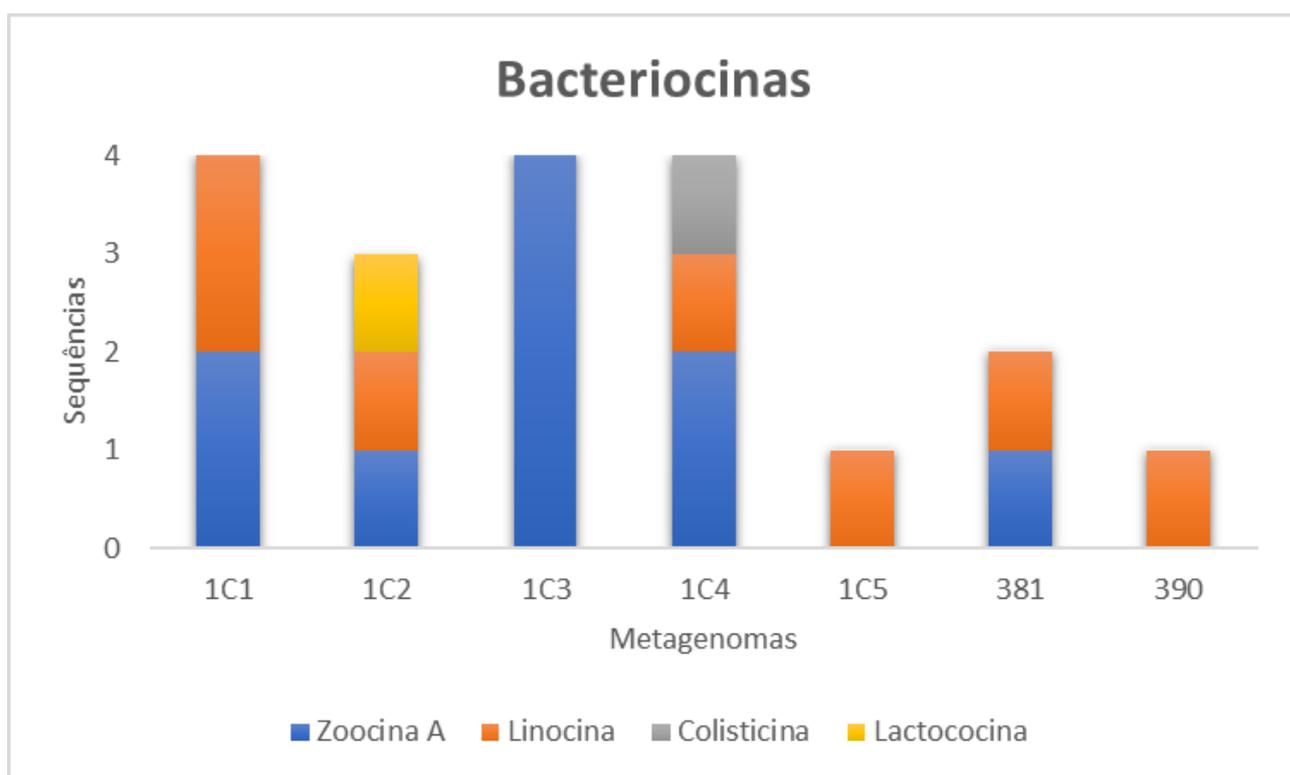


Figura 45: Gráfico de barras apresentando as sequências de bacteriocinas encontradas para cada metagenomas. Apenas os metagenomas 377 e 387 não apresentaram bacteriocinas.

4.4 - Discussão

Assim como os trabalhos anteriores do nosso grupo, incluindo os realizados por nossas linhas de pesquisa mencionados no capítulo 2 e 3, buscar novas fontes de substâncias antimicrobianas para combater estirpes patogênicas resistentes é fundamental. A bioprospecção em ambientes aquáticos é de grande relevância nessa busca. Sendo assim, o Rio São Benedito, localizado no estado do Pará, foi selecionado para realizar a bioprospecção de bactérias produtoras de substâncias antimicrobianas em peixes nativos e também analisar as bactérias que estão presentes na água deste rio. O local de amostragem, o Rio São Benedito (PA), caracteriza-se por ser um local com baixo impacto antropogênico, de água doce e muito diferente da Lagoa Rodrigo de Freitas (RJ) que sofre os impactos de estar inserida numa cidade urbana de grande densidade populacional e possui um canal pelo qual entra água salgada do mar. Sendo importante fazer essa avaliação, já que a pressão humana molda o microbioma do local, podendo levar ao desenvolvimento de resistência antimicrobiana (Duarte *et al.*, 2022). Como também a produção de diversas substâncias tóxicas que as auxiliam na competição com outras bactérias, por exemplo as bacteriocinas que oferecem uma vantagem competitiva às bactérias produtoras.

4.4.1 Bactérias antagonistas isoladas de água e peixes

Isolar bactérias de peixes e animais marinhos é uma excelente abordagem para encontrar diversas bactérias produtoras de substâncias antimicrobianas. Como mencionado no trabalho de Fotso e colaboradores (2022), que fez uma bioprospecção em bactérias do ácido láctico (LAB) isoladas de peixes para verificar a produção de bacteriocinas, avaliando o potencial de uso como bioconservantes. Foram isoladas 88 bactérias lácticas e a estirpe F01 da espécie *Lactococcus lactis* foi capaz de produzir bacteriocina. Um outro trabalho verificou a produção de bacteriocinas em 116 bactérias isoladas de amostras de peixes e frutos do mar, das quais foram detectadas 16 bactérias do ácido láctico produtoras de bacteriocinas. As que apresentaram maior halo de inibição contra todas as bactérias do gênero *Listeria* testadas, foram as estirpes: *Enterococcus mundtii* LP17, isolada de salmonete e produtora da bacteriocina bacLP17, e a estirpe *E. mundtii* LP18, isolada de sardinha e produtora da bacteriocina bacLP18 (Iseppi *et al.*, 2019). Na presente tese foram isoladas 71 bactérias oriundas de peixes do Rio São Benedito, dentre essas, 46 bactérias apresentaram atividade antimicrobiana contra alguma das bactérias patogênicas testadas. Pereira e colaboradores (2022) afirmam que o

ambiente aquático possui condições que influenciam a microbiota dos animais marinhos e muitos produzem substâncias de interesse biotecnológico. Com essa afirmação e os resultados obtidos nesta tese, pode-se perceber que buscar bactérias em ambiente aquático é uma abordagem bem sucedida para conseguir isolar bactérias produtoras de substâncias antimicrobianas.

As estirpes isoladas dos peixes *S. rhombeus* e testadas para a produção de substâncias antimicrobianas, conseguiram inibir diversas estirpes patogênicas, como: *Acinetobacter baumannii*; *Escherichia coli* ESBL; *Enterococcus cloacae* NDM, *Klebsiella pneumoniae* (KPC e ESBL); *Pseudomonas aeruginosa* SPM; *Salmonella typhimurium*; *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Entretanto, algumas destas estirpes patogênicas apresentam resistência à drogas. Este resultado mostra o quão importante é realizar a bioprospecção em ambientes aquáticos para buscar novas substâncias com potencial uso contra estirpes patogênicas resistentes. Como a bactéria *E. coli* produtora de β -lactamase de espectro estendido (ESBL), que vem sendo disseminada pelo mundo todo, causando doenças não só nos homens, como também perdas econômicas na indústria avícola. A presença de bactérias resistentes em animais, que são fonte de alimentos para os homens, torna este um problema de saúde pública (Yoon & Lee, 2022). Outro gênero também relatado por ter estirpes patogênicas, que produzem toxinas e podem possuir resistência a diversos antimicrobianos, é o gênero *Acinetobacter* (Ibrahim *et al.*, 2021). Os microrganismos *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter cloacae* formam um grupo de seis patógenos, nomeado de ESKAPE, estes são conhecidos por suas resistências aos antibióticos. Um trabalho recente, verificou o perfil de suscetibilidade a antibióticos de microrganismos pertencentes a este grupo. Observou-se que todos os microrganismos apresentaram resistência extensiva a drogas (XDR), isso significa que a bactéria é resistente a um ou mais antibióticos em quase todas as categorias. Já a estirpe de *S. aureus* era resistente a múltiplas drogas (MDR), sendo resistente a um ou mais antibióticos de três ou mais categorias testadas (Zalegh *et al.*, 2022). O estudo mostrou a necessidade de buscar novos compostos capazes de combater essas bactérias patogênicas resistentes (ESKAPE). Nesta tese, diversas bactérias do grupo ESKAPE foram testadas para verificar se seriam inibidas por meio de bactérias ambientais. Os resultados dos testes de antagonismos das bactérias isoladas dos peixes *S.*

rhombeus, mostram que as bactérias ambientais isoladas são capazes de inibir uma gama de patógenos, incluindo muitas do grupo ESKAPE.

As estirpes Sr1 e Sr5 apresentaram um maior espectro de ação, inibindo 8 e 6 estirpes patogênicas, respectivamente, dentre as 12 testadas e possuem um perfil de inibição semelhante (Figura 34). A estirpe Sr1 conseguiu inibir: *A. baumannii* não produtora de OXA 23, *E. coli* ESBL, *E. cloacae* NDM, *K. pneumoniae* (KPC e ESBL), *P. aeruginosa* (SPM e Não SPM) e *S. aureus* ATCC 6538. Entretanto, não conseguiu inibir as estirpes: *P. aeruginosa*, *E. faecalis* 5ae, *S. epidermis* e *S. typhimurium* ATCC 13311. As duas estirpes foram isoladas das amostras oriundas da região (A) boca do peixe. Por meio dos testes de antagonismos, foi possível concluir que as estirpes oriundas da (A) boca e da região (C) ânus dos peixes apresentaram maior produção de substâncias antimicrobianas. Sendo 23 bactérias produtoras isoladas da região (A) boca, 7 da região (B) brânquias e 16 da região (C) ânus dos peixes. Devido a este resultado, foram selecionadas as amostras da região (C) ânus dos 5 indivíduos e com essas amostras foi realizado o sequenciamento metagenômico e assim foi possível avaliar a comunidade do microbioma e seus potenciais genes de produção de substâncias antimicrobianas.

4.4.2 Diversidade bacteriana

No que concerne à diversidade bacteriana encontrada nos microbiomas de estudo, os filos predominantes para os metagenomas oriundos das amostras de água do Rio São Benedito foram: Proteobacteria e Actinobacteria em maior quantidade e também os filos Firmicutes, Bacteroidetes, Cyanobacteria e Verrucomicrobia em menor proporção. A composição da comunidade microbiana presente em ambiente terrestre, como o solo e a presente em ambiente aquático, como os lagos e rios são distintas, tendo uma maior abundância de bactérias em alguns filos. Assim como, há diferença na composição do microbioma de amostras oriundas de ambiente aquático salino e ambiente aquático de água doce (Logares *et al.*, 2010). Um trabalho realizado com amostras de água marinha, coletada na costa atlântica no nordeste de Portugal, avaliou os metagenomas e pode-se observar a prevalência dos filos Proteobacteria, Cyanobacteria, Bacteroidetes e Actinobacteria (Duarte *et al.*, 2022). Já em ambientes de água doce, como os rios e lagos, há a prevalência de bactérias pertencentes aos filos Actinobacteria e Proteobacteria (Ghai *et al.*, 2011; Newton *et al.*, 2011). Como no trabalho de Ghai e colaboradores (2011) que analisou o metagenoma de amostras de água do Rio Amazonas e foi observado uma maior

abundância de bactérias pertencentes ao filo Actinobacteria, contendo de 20 - 25% de leituras alinhadas para esse filo. Seguindo do filo Proteobacteria com as classes (alfa, beta e gama). Sendo este resultado semelhante ao encontrado nos metagenomas de água do Rio São Benedito, analisados nesta tese. Por meio desses trabalhos, pode-se perceber que o filo Actinobacteria é mais encontrado em ambiente de água doce e o filo Proteobacteria em ambiente marítimo, mostrando que a salinidade da água interfere diretamente na composição do microbioma presente na água (Lozupone & Knight, 2007).

Já o outro microbioma analisado foi oriundo da região do ânus dos peixes da espécie *S. rhombeus*. Este peixe é conhecido popularmente como “piranha preta” e foi selecionado devido aos seus hábitos alimentares, pois são piscívoros (Van der Sleen & Albert, 2018), por serem itinerantes, estando presentes em todas as partes do Rio São Benedito, e por ser uma das espécies mais conhecidas. Por meio da análise dos metagenomas das amostras oriundas da região ânus dos peixes, os filios mais encontrados foram: Firmicutes e Actinobacteria. O trabalho de Tyagi e colaboradores (2019) avaliou a composição da microbiota intestinal do peixe *Labeo rohita*, popularmente conhecido como carpa, oriundo de água doce por meio da técnica de metagenômica por *shotgun*. Como resultado foram identificados 36 filios, 326 famílias e 985 gêneros. O filo predominante, representando $\frac{3}{4}$ dos microrganismos, foi Proteobacteria. Um outro trabalho analisou o microbioma de muco da pele e intestino de duas espécies de peixes de água doce da Amazônia: *Serrasalmus rhombeus* e *Mesonauta festivus*. O microbioma intestinal das duas espécies de peixes resultaram em alta abundância relativa de bactérias do filo Proteobacteria (Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria e Alfacaproteobacteria), seguida dos filios Fusobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes (Sylvain *et al.*, 2019). Na literatura há relatos que no microbioma do intestino de peixes é comum encontrar bactérias pertencentes ao filo Proteobacteria como sendo as mais abundantes (Sylvain *et al.*, 2019). Ghanbari, Kneifel e Domig (2015) afirmam que 90% da microbiota do intestino dos peixes corresponde aos filios: Proteobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes. Na presente tese, apesar do filo Proteobacteria ser o mais abundante nas quatro amostras oriundas da água do Rio São Benedito, para os metagenomas oriundos da região ânus dos peixes dos cinco indivíduos do peixe *S. rhombeus* o filo predominante foi o Firmicutes. Mostrando que apesar da interferência das bactérias encontradas no ambiente aquático, no qual o peixe se encontra, a dieta influencia diretamente no microbioma do intestino dos peixes, como relatado por Lauzon e colaboradores (2010) e Egerton e colaboradores

(2018). Além disso, pode-se especular que a diferença na composição da microbiota também pode ocorrer devido ao metagenoma ser de uma região do peixe mais específica (ânus). Sendo assim, pode ocorrer uma competição bacteriana, selecionando certos gêneros pertencentes ao filo Firmicutes.

Ao analisar a alfa diversidade, pode-se verificar que as amostras de água do Rio São Benedito (PA) apresentam uma maior alfa diversidade, contendo o número de OTU maior do que a dos metagenomas oriundos da região do ânus dos peixes da espécie *S. rhombeus*. O metagenoma 1C3 apresentou uma menor diversidade, tendo menos OTUs que os demais. Ao analisar o Chao1 é possível verificar que o metagenoma de peixe 1C3 apresentou uma riqueza menor que os demais e o metagenoma 1C5 é o que possui o Chao1 mais alto, contendo muitos táxons raros, contendo um ou dois representantes (*singleton* e *doubleton*). Avaliando o índice de Shannon foi possível confirmar que os metagenomas de água são mais diversos que os metagenomas oriundos da região ânus dos peixes. Esse fato pode ocorrer devido a região do ânus dos peixes ser uma região mais reservada e alguns gêneros podem se sobrepôr a outros, devido ao poder de adaptação ao ambiente, como também por meio da competição entre os microrganismos. Dentre os metagenomas da região ânus dos peixes, o 1C3 apresentou um índice de shannon menor, mostrando a baixa intravariabilidade deste metagenoma. Já o 1C2 é o metagenoma oriundo dos peixes, que apresentou uma maior diversidade. Já para a análise da beta diversidade foi possível verificar que a intravariabilidade dos metagenomas de amostras de água do Rio São Benedito é menor do que a dos metagenomas oriundos da região do ânus dos peixes, sendo assim os metagenomas da região ânus dos peixes apresentam uma variação maior na comunidade. O metagenoma 1C3 é o mais dissimilar dos metagenomas. Já comparando os dois grandes grupos, a intervariabilidade é grande, sendo assim, a comunidade microbiana é diferente, levantando um pensamento sobre a alimentação deste indivíduo momentos antes da coleta.

Além de realizar a classificação filogenética dos metagenomas oriundos da região ânus dos peixes, por meio das outras etapas desta tese, foi possível comparar os gêneros de bactérias isoladas com os gêneros identificados nos metagenomas. Os gêneros isolados foram identificados como: *Bacillus*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Microbacterium*, *Priestia*, *Brevibacterium*, *Kocuria* e *Sphingomonas*. Sendo os gêneros *Bacillus* e *Serratia* com uma quantidade maior de bactérias isoladas. Já na comparação com os metagenomas da região

ânus dos peixes, foi possível identificar a presença de diversos gêneros, como: *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Kocuria*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, entre outros. Pela verificação dos gêneros presentes em pelo menos 20% das leituras em no mínimo um dos metagenomas, foi possível ver a predominância dos gêneros: *Staphylococcus* e *Kocuria* para os metagenomas 1C1, 1C4 e 1C5. Já o 1C2 foi mais representado por *Kocuria* e *Enterococcus* e o metagenoma 1C3 apresentou um microbioma distinto dos demais, sendo os gêneros mais abundantes: *Enterococcus* e *Staphylococcus*. Ao comparar a biodiversidade microbiana pelas metodologias de sequenciamento de DNA de nova geração, como metagenômica *Shotgun*, e as metodologias de isolamento, podemos ver que a análise metagenômica trouxe 10 – 20 vezes mais OTUs identificadas do que as estirpes isoladas. A técnica *shotgun* é menos seletiva do que o isolamento bacteriano e com isso, representa de uma forma melhor a biodiversidade microbiana. Para fins de bioprospecção de novos genes, a combinação das análises *in vitro*, por meio do isolamento e detecção de atividade antimicrobiana, com as análises *in silico*, como o estudo de metagenômica *shotgun*, o qual descreve melhor o DNA no ambiente, aumenta as chances de novas descobertas de bacteriocinas entre outras vias metabólicas de interesse. Neste estudo os gêneros *Staphylococcus* e *Kocuria* foram identificados como sendo os mais abundantes nos metagenomas, as quais foram isoladas dos peixes. Sendo assim, as estirpes desses gêneros serão alvos para estudos futuros.

4.4.3 As categorias funcionais dos metagenomas do Rio São Benedito e dos peixes *Serrasalmus rhombeus* (piranha preta) – biorremediação

4.4.3.1 Genes relacionados a biodegradação de xenobióticos

Breton-Deval e colaboradores (2020) afirmam que a poluição faz uma pressão seletiva sobre os microrganismos e assim, selecionam os microrganismos com metabolismo mais adequado para tolerar ou até mesmo transformar o meio poluído, com isso, o ambiente é uma força de evolução. Pelos resultados obtidos pela ferramenta KEGG, pode-se verificar que os microrganismos encontrados nos peixes possuem 10 vezes mais genes ortólogos envolvidos em degradação e adaptação a ambientes poluídos, do que os microrganismos encontrados nas amostras de água. Isto pode ocorrer devido um processo de biomagnificação, onde o peixe fornece um ambiente mais propício para micróbios que têm genes que degradam poluentes. Sendo assim, observou-se uma diferença entre o microbioma dos peixes e o microbioma das amostras de água. A região

de amostragem é longe de cidades e menos impactada por atividades antropogênicas. Os microrganismos que estão na água não estão tão abundantes e assim a detecção desses genes relacionados à adaptação e tolerância a ambientes poluídos foi menos detectado.

4.4.3.2 Genes relacionados aos plasmídeos

Pelo uso das ferramentas PlasmidFinder e ABRicate foi possível avaliar a presença de plasmídeos nos metagenomas. A sequência do plasmídeo encontrado no metagenoma 1C1 está relacionado à resistência à lincosamida. Assim como, também foram encontradas sequências relacionadas à resistência à vancomicina no metagenoma 1C3. O plasmídeo ColE1 foi encontrado no metagenoma 1C4, este plasmídeo é muito utilizado nas áreas de biotecnologia, por meio da técnica de DNA recombinante e é um plasmídeo bastante caracterizado (Chaillou *et al.*, 2022). Este plasmídeo, encontrando em *Escherichia coli*, foi originalmente relacionado à síntese da bacteriocina colicina E1, juntamente com os genes que conferem imunidade à morte por colicina e mobilidade (gene *mob*) (Dougan, Crosa & Falkow, 1978). Ainda no metagenoma 1C4, também foi encontrada uma sequência do plasmídeo colicinogênico (COL) ColIb-P9 que contém o tamanho de 93 kb (Bates *et al.*, 1999). Este plasmídeo possui uma proteína de ligação ao DNA (SSB) que é muito semelhante ao gene *ssb* encontrado no plasmídeo F. Esta proteína está relacionada ao processo conjugativo do DNA (Howland *et al.*, 1989).

Não foram encontradas muitas sequências relacionadas à resistência bacteriana aos antibióticos através da análise pelo banco de dados do ABRicate. Esses dados juntamente com o histórico do local de coleta, com pouco impacto humano, corroboram com a hipótese de Duarte e colaboradores (2022) de analisar o resistoma, conjunto de sequências de genes de resistência a antibióticos e a metais pesados em bactérias patogênicas e não patogênicas, para avaliar os níveis de impactos antrópicos. Na presente tese foram encontrados poucos genes relacionados à resistência. Sendo encontrado mais em metagenomas oriundos da região ânus dos peixes, indicando a prevalência dessas bactérias resistentes a antibióticos nesses metagenomas.

4.4.4 Substâncias antimicrobianas nos metagenomas

Ao analisar a subcategoria de “Biossíntese de metabólitos secundários” (Figura 42) em relação à busca por substâncias antimicrobianas foram anotados genes

relacionados à produção de antibióticos para os metagenomas 1C3, 1C4 e 1C5. O metagenoma 1C3 teve genes anotados para a via de biossíntese de acarbose e validamicina. A validamicina é um antibiótico da classe aminoglicosídeo e antifúngico, que também é um substrato para a síntese de algumas drogas antidiabéticas, representando uma substância importante na estrutura da acarbose, que é uma substância hipoglicemiante (Tan *et al.*, 2015). A via de biossíntese de betalaína, está anotada para o metagenoma 381, a betalaína é um corante de origem vegetal, que já foi descrito por ter diversas atividades, incluindo a atividade antimicrobiana (Wijesinghe & Choo, 2022). Para os metagenomas 1C2, 1C3 e 1C5 foram anotados genes relacionados à produção de carbapenema, que é uma classe de antibiótico β -lactâmico, muito utilizado e eficiente (El-Gamal *et al.*, 2017). A via de biossíntese de fenazina foi anotada para os metagenomas 1C1, 1C3 e 1C4. A fenazina é classificada como um antibiótico de origem bacteriana, produzido geralmente por bactérias da espécie *Pseudomonas aeruginosa* (Huigens, Abouelhassan & Yang, 2019). A via de biossíntese de monobactâmicos foi anotada para todos os metagenomas oriundos da região ânus dos peixes (1C1-1C5), os monobactâmicos são antibióticos, no qual nenhum anel é fundido ao anel β -lactâmico (Lima *et al.*, 2020). A via de biossíntese de neomicina, canamicina e gentamicina foi anotada para o metagenoma 1C2, os quais são antibióticos aminoglicosídeos. A via de biossíntese da novobiocina foi anotada para todos os metagenomas oriundos da região ânus dos peixes (1C1-1C5) e o metagenoma 381 oriundo da água do Rio São Benedito. Esta substância é um antibiótico aminocumarínico oriundo da espécie bacteriana *Streptomyces niveus* (Klimko *et al.*, 2022). A via de biossíntese de penicilina e cefalosporina está anotada para os metagenomas 1C1 e 1C2, tendo genes relacionados à biossíntese desses antibióticos. Todos os metagenomas oriundos da região ânus dos peixes (1C1-1C5) e o metagenoma 381 oriundo de água possuem genes anotados na via de biossíntese de prodigiosina, esta substância é um alcalóide, que é o pigmento vermelho natural da bactéria *Serratia marcescens*. A prodigiosina já foi descrita na literatura como uma substância com atividade antimicrobiana (Lapenda *et al.*, 2015). A via de biossíntese de estreptomicina foi anotada para os metagenomas 1C1, 1C2, 1C3 e 1C4, esta substância é um antibiótico aminoglicosídeo de ação bactericida. Os dados obtidos indicam que fazer a bioprospecção de bactérias produtoras de substâncias antimicrobianas em ambientes aquáticos é uma alternativa promissora, podendo descobrir novos metabólitos ativos.

Na análise da ferramenta AntiSMASH, foi possível anotar 4 *clusters* gênicos para o metagenoma 1C2. Foram anotados dois *clusters* NI-sideróforo. O primeiro *cluster* possui o gene de biossíntese da micobactina, que é um sideróforo descrito em micobactérias e é expresso em condições de estresse, quando há pouco ferro disponível no ambiente. Este sideróforo capta o ferro que é fundamental para o desenvolvimento da célula. Além disso, há estudos dos sideróforos micotina que afirmam que estes podem atuar como novas drogas antituberculose (Shyam *et al.*, 2022). O segundo *cluster* de sideróforo anotado possui o gene de biossíntese do sideróforo aerobactina. O *cluster* de terpeno engloba genes relacionados com a síntese de esqualeno e carotenóides. Os carotenóides são pigmentos isoprenóides, produzidos pelo metabolismo secundário das bactérias. Possuem função de proteção da célula, contra a radiação UV e contra danos oxidativos e também auxiliam no mecanismo de fluidez da membrana (Vila *et al.*, 2019). Já o esqualeno é convertido em vários esteróis, que estão presentes na membrana celular em bactérias que não possuem parede celular, sendo utilizados para conferir estabilidade à membrana. Os carotenóides são análogos aos esteróis, ambos atuam regulando a dinâmica da membrana (Kumar *et al.*, 2019). Em relação as substâncias antimicrobianas, o *cluster RiPP-like* possui um gene de biossíntese central de produção da bacteriocina lactococina A. Esta foi descrita pela primeira vez em bactérias da estirpe *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LMG 2130, que apresenta atividade estrita, podendo inibir bactérias do gênero *Lactococcus* (Holo, Nilssen & Nes, 1991). Para o metagenoma 1C4, foi anotado um gene de biossíntese de sideróforo, após a análise da sequência no UniProt foi possível verificar similaridade com uma sequência de produção do sideróforo aerobactina. A aerobactina é um sideróforo, citrato-hidroxiato, relatado como um fator de virulência para bactérias patogênicas entéricas. Também está envolvida na formação de biofilmes e auxilia na resistência ao estresse oxidativo e remoção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) (Li *et al.*, 2021). O ambiente aquático possui baixa quantidade de ferro, e esta é uma substância importante para as bactérias desempenharem suas funções metabólicas (Smith *et al.*, 2004). Com isso, os sideróforos, que são metabólitos secundários específicos para íons de ferro, são importantes, pois permitem que as bactérias capturem os ferros das proteínas carreadoras e os transportem para dentro do citoplasma. O sideróforo aerobactina garante aptidão às bactérias que os têm, pois as permitem adquirir o ferro, até mesmo em meio onde este é escasso. Além disso, impossibilita a aquisição de ferro pelas bactérias que não possuem o sistema sideróforo-ferro e assim impedem o crescimento da bactéria. Um exemplo é a

estirpe *Vibrio fischeri* ES114, que possui genes de produção e captação do sideróforo aerobactina, e é capaz de inibir o crescimento da bactéria *V. fischeri* ES114, que não produz aerobactina, quando estão em condições ambientais com baixa quantidade de ferro. Mostrando que o sideróforo pode ser o inibidor do crescimento da bactéria (Eickhoff & Bassler, 2020).

Nos metagenomas analisados neste trabalho foram encontrados genes relacionados à produção de bacteriocinas, como: zoocina A, Lactocina, linocina M18, closticina. Assim como no trabalho de Ghosh e colaboradores (2021), que analisou metagenomas oriundos de amostras de água do lago de água doce Rabindra Sarovar, localizado na Índia, para avaliar a presença de genes metabolizadores de arsênio e metabólitos secundários. Os filos mais predominantes encontrados foram Proteobacteria, Bacteroidetes e Cyanobacteria. Para a anotação funcional, foram encontrados genes relacionados ao metabolismo e resistência ao arsênio e genes de produção da bacteriocina zoocina A, proclorosina e microcina. Outros trabalhos que também relataram a presença de zoocina em ambiente aquático, como o trabalho de Ghosh e colaboradores (2021), citado anteriormente. A zoocina A é uma bacteriocina oriunda da estirpe *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* 488, é uma exoenzima lítica com atividade contra bactérias intimamente relacionadas. Por ser uma endopeptidase, esta bacteriocina atua hidrolisando a estrutura do peptidoglicano da bactéria alvo (Heath *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2013). O gene de produção da zoocina A é o *zooA*, já o gene que garante a imunidade à bactéria produtora é o gene *zif* (Gargis *et al.*, 2009). A zoocina A possui uma estrutura com dois domínios, a região N-terminal é o domínio catalítico (CAT, do inglês *domain responsible for catalysis*), conhecido como peptidase M23 e a região C-terminal contém o domínio de ligação ao substrato (SBD, do inglês *substrate-binding domain*), isto é, domínio responsável pelo reconhecimento do alvo (TRD, do inglês *target recognition domain*) (Lai, Tran & Simmonds, 2002; Chen *et al.*, 2013). Assim com a bacteriocina zoocina, a linocina também está difundida nos metagenomas analisados na presente tese. A bacteriocina linocina M18 foi isolada da bactéria *Brevibacterium Linens* M18 oriunda de queijo de mancha vermelha, a substância tem atividade contra bactérias Gram-positivas, principalmente bactérias do gênero *Listeria* e também inibe diversas bactérias corineformes. Esta bacteriocina é termolábil, sensível à protease e estável entre o pH 3 e 12 (Valdés-Stauber & Scherer, 1994). Outros gêneros já foram relatados por possuírem o gene estrutural de produção da linocina M18, como: *Arthrobacter* e *Corynebacterium*

(Valdés-Stauber & Scherer, 1996). Assim como o gênero *Streptomyces*, no qual foram realizadas análises *in silico* em duas estirpes (*Streptomyces benahoarensis* MZ03-37^T e MZ03-48) e foi relatada a presença de *clusters* de genes envolvidos na produção de antimicrobianos, como a linocina-M18 e curamicina. Outra bacteriocina encontrada nos metagenomas analisados nesta tese foi a closticina 574, que é uma bacteriocina pertence à classe II, produzida originalmente pela estirpe bacteriana *Clostridium tyrobutyricum* ADRIAT 932. Possui atividade contra bactérias estritamente relacionadas, inibindo bactérias Gram-positivas, como estirpes de *C. tyrobutyricum* e também alguns lactobacilos: *C. tyrobutyrium* CNRZ500, *C. tyrobutyrium* NIZO B575, *C. tyrobutyrium* NIZO B570, *C. beijerinckii* ATCC 25752, *Lactobacillus sake* ATCC 15521, *L. buchneri* L4 e *L. alimentarius* L4. É um peptídeo com 310 resíduos de aminoácidos e após ser processado, produz uma bacteriocina de 82 aminoácidos (Kemperman *et al.*, 2003). Além dessas análises, para o metagenoma 1C1 foi encontrada a proteína RdgB que ativa diretamente a transcrição do gene *cTV*. Este gene está relacionado à produção da bacteriocina carotovoricina, que é semelhante à cauda de fago e à produção da pectina liase (Pnl) que está ligada à resposta a danos ao DNA, descritas no genoma da bactéria da estirpe *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Er (Yamada *et al.*, 2008).

Comparando as sequências de bacteriocinas encontradas nos metagenomas da região ânus dos peixes e as atividades antagônicas das bactérias que foram isoladas da região ânus dos peixes, foi apurado que as bactérias isoladas dos indivíduos 1C1, 1C2 e 1C3 possuem um amplo espectro de ação, inibindo bactérias tanto Gram-positivas, quanto Gram-negativas. E os metagenomas destes indivíduos apresentaram sequências de duas distintas bacteriocinas: zoocina A e linocina M18. O indivíduo 1C2 apresentou três diferentes bacteriocinas, sendo estas: lactocina, zoocina A e linocina M18. As bactérias isoladas do indivíduo 1C4, apresentaram um espectro de ação voltado para as bactérias Gram-negativas. Após análise do metagenoma desta amostra, foi encontrada sequência relacionada à produção da bacteriocina closticina. Esta bacteriocina foi isolada de bactérias do gênero *Clostridium*, que possui atividade inibitória contra bactérias Gram-positivas (Kemperman *et al.*, 2003). O resultado dos genes de bacteriocinas encontradas nos metagenomas corrobora com os resultados do espectro de ação das bactérias isoladas do indivíduo 1C4, avaliado em testes fenotípicos.

No trabalho de Tyagi e colaboradores (2019), o qual analisa metagenomas do intestino de peixes foi identificada a prevalência de bactérias do filo Actinobacterias. Além disso, foram encontradas diversas vias de biossíntese de antibióticos. Nesta tese, também há a prevalência de bactérias do filo Actinobactérias, assim como há a presença de genes relacionados à produção de substâncias antimicrobianas, tanto para os metagenomas oriundos do ânus dos peixes, como também para os metagenomas oriundos de água, indicando um potencial para bioprospecção de novos compostos naturais oriundos dessas amostras. Um outro trabalho que utiliza a metagenômica para avaliar o potencial de produção de substâncias antimicrobianas foi realizado por Costa e colaboradores (2022), no qual foram analisadas amostras de três camadas da coluna d'água (fótica, afótica e sedimentar) da usina hidrelétrica Tucuruí, localizada no estado do Pará, para avaliar o potencial de produção de bacteriocinas. Para isso, a técnica de metagenoma por *shotgun* foi escolhida. A busca de bacteriocinas foi realizada utilizando a plataforma BAGEL. Foram encontradas diversas bacteriocinas, sendo: sonorensina, klebicina D, piocina e colicina as mais abundantes. Além disso, também determinaram a estrutura tridimensional da bacteriocina zoocina. A região que apresentou um maior número de sequências de bacteriocinas foi a zona fótica. Como visto, a usina hidrelétrica Tucuruí é uma região rica em substâncias antimicrobianas, sendo um excelente local para realizar a bioprospecção de bactérias com potencial antimicrobiano. A usina hidrelétrica analisada no trabalho Costa e colaboradores (2022) é abastecida pelo Rio Tocantins (PA). Assim como as análises desta tese, que visa realizar a bioprospecção de substâncias antimicrobianas em ambiente aquático, incluindo amostras de água do Rio São Benedito localizado no estado do Pará. Ambos trabalhos relatam a presença de bacteriocinas nas águas dos Rios localizados no estado do Pará, sendo um ambiente com grande potencial para realizar a bioprospecção destas moléculas.

4.5– Conclusão

Neste capítulo, pelo uso da técnica de análise metagenômica *shotgun*, pode-se verificar que a biodiversidade das amostras de água do Rio São Benedito é mais diversa, contendo um número maior de OTUs do que as amostras da região ânus dos peixes da espécie *S. rhombeus*. Este fator pode ocorrer devido à pressão seletiva dessa região, selecionando certos gêneros em detrimento a outros. Nos metagenomas oriundos da região ânus dos peixes, os gêneros *Kocuria* (Actinobacteria) e *Staphylococcus* (Firmicutes) foram os mais abundantes e o gênero *Mycobacterium* (Actinobacteria) foi o mais abundante nas amostras de água. Já nas análises *in vitro* foi possível isolar mais bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Serratia*, seguidos por *Staphylococcus*, *Microbacterium*, *Priestia*, *Brevibacterium*, *Kocuria* e *Sphingomonas*. Esses resultados, mostram a importância de realizar o sequenciamento metagenômico para analisar a biodiversidade contida nesse microbioma, em detrimento de realizar apenas a análise *in vitro*. Em relação a produção de substâncias antimicrobianas, pode-se concluir que realizar a bioprospecção dessas substâncias em peixes e amostras de água é uma alternativa favorável, podendo detectar a produção de substâncias antimicrobianas em diversas bactérias isoladas *in vitro*. Além disso, pelas análises *in silico* dos metagenomas foi possível identificar uma série de genes relacionados a biossíntese de inúmeros metabólitos e proteínas com ação antimicrobiana, como as bacteriocinas: a zoocina, lactocina, linocina e closticina. Também foram anotadas diversas vias pela ferramenta KEGG, como vias de produção de antibióticos. Os metagenomas oriundos da região ânus dos peixes apresentaram uma maior quantidade de sequências relacionadas a produção de substâncias antimicrobianas do que os metagenomas oriundos de água do Rio São Benedito (PA). Pela busca das bacteriocinas e vias de produção de antibióticos, pode-se inferir que essas bactérias possuem um amplo espectro de ação, assim como as bactérias isoladas e testadas na bancada, as quais podem inibir várias bactérias patogênicas, como visualizado nos testes de antagonismo realizado nesta tese. Comparando as bactérias isoladas e testadas para verificar a produção de substâncias antimicrobianas na bancada com as análises realizadas nos metagenomas oriundos da região ânus dos peixes, pode-se confirmar que há diversas bactérias produtoras de bacteriocinas que habitam peixes e ambiente aquático. Sendo assim, o microbioma de peixes e rios, com baixa pressão antropológica, é uma fonte riquíssima para a bioprospecção de moléculas antagônicas a bactérias patogênicas.

Discussão e Conclusão
Geral

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO GERAL

Diante do histórico de relatos realizado no trabalho de Silva (2018), o ambiente aquático é rico em estirpes bacterianas com potencial biotecnológico, podendo produzir diversas substâncias antimicrobianas, como as bacteriocinas. Também foi possível observar que peixes coletados de uma feira livre apresentam uma grande quantidade de estirpes do gênero *Aeromonas*, e que este gênero tem um alto potencial antagônico, contendo diversas estirpes produtoras de bacteriocinas. Estes resultados podem ser observados no capítulo 2, o qual analisa o genoma da bactéria *Aeromonas allosaccharophila* estirpe AE59-TE2 e também no capítulo 3, que avalia a cultura mista 38-XC4, composta por *Aeromonas salmonicida* AE38-XC4 e *Acinetobacter pittii* ACP38-XC4. Sendo assim, foi levantada a hipótese de que outros ambientes aquáticos também poderiam conter uma gama de bactérias produtoras de substâncias antimicrobiana. Então, foi avaliado o potencial de produção de substâncias antimicrobianas por bactérias oriundas do ambiente aquático e de peixes do Rio São Benedito, localizado no estado do Pará.

No trabalho de Silva (2018) foi iniciada a análise de bactérias isoladas de ambiente aquático, mais especificamente a Lagoa Rodrigo de Freitas, localizada no Rio de Janeiro, sendo melhor exploradas nos capítulos 2 e 3, desta tese. Este ambiente sofre grande impacto ambiental, está cercado por moradias e recebeu rejeitos humanos devido ao descarte inadequado de resíduos. No capítulo 4 da presente tese, foram avaliadas amostras de água do Rio São Benedito (PA), o qual sofre menos impacto antrópico por ser uma área mais reservada. Ao comparar as sequências metagenômicas e todo o *pool* gênico encontrado no microbioma água com as bactérias isoladas da água da Lagoa Rodrigo de Freitas, pode-se verificar que ambos os ambientes possuem bactérias produtoras de substâncias antimicrobianas.

Analisando as bactérias isoladas de amostra de água da Lagoa Rodrigo de Freitas (RJ) e dos peixes, juntamente com as bactérias isoladas dos cinco indivíduos do peixe da espécie *S. rhombeus*, pode-se verificar uma alta taxa de bactérias produtoras de substâncias antimicrobianas. Muitas das bactérias isoladas e estudadas nessa tese são capazes de inibir bactérias patogênicas, algumas apresentando resistência aos antimicrobianos. Como as bactérias do grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*,

Staphylococcus aureus, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter cloacae*). Portanto, o estudo dessas substâncias produzidas por bactérias oriundas de ambiente aquático e peixes é de grande importância, podendo gerar novos medicamentos capazes de combater infecções que antes não eram tão fáceis de serem tratadas. Diminuindo as mortes causadas por bactérias patogênicas multirresistentes, como já é relatado no trabalho de Plackett (2020), o qual afirma que aproximadamente 700 mil pessoas morrem anualmente em todo o mundo devido a bactérias patogênicas.

Analisando as bactérias isoladas dos peixes da espécie *Serrasalmus rhombeus*, conhecido popularmente por piranha preta, oriundos do Rio São Benedito foi possível isolar um total de 71 bactérias, sendo 45 com atividade contra bactérias patogênicas. Assim, 63,38% das bactérias isoladas dos peixes da espécie *S. rhombeus* são produtoras de substâncias antimicrobianas. Já para as 57 bactérias isoladas da Lagoa Rodrigo de Freitas e dos peixes coletados de feira livre das espécies: *Mugil brasiliensis*, de nome popular tainha e *Caranx latus* de nome popular xerelete (apresentados no capítulo 2 e 3), foi possível observar um total de 38 estirpes do gênero *Aeromonas* que foram detectadas como produtoras de substâncias antimicrobianas, sendo 26 oriunda dos peixes e 12 de amostras de água. Resultando em um total de 66,67% de bactérias produtoras de substâncias antimicrobianas. Mostrando que a abordagem de fazer a bioprospecção de bactérias produtoras de substâncias ativas em peixes e ambiente aquático é bem sucedida.

Em comparação com outros trabalhos descritos na literatura que também realizaram a triagem para isolar bactérias de peixes e outros animais marinhos e detectar a produção de substâncias antimicrobianas, foi possível verificar que esta é uma abordagem favorável. Como no trabalho de Fotso e colaboradores (2022) que fez a triagem para avaliar a produção de substâncias antimicrobianas em bactérias isoladas de peixes da cidade Batié em Camarões (*Cyprinus carpio* e *Arius africanus*) e oriundos de pescadores (*Sardina pilchardus*, *Silurus glanis*, *Penaeus monodon*, *Oreochromis niloticus* e *Penaeus indicus*), do qual foram isoladas 88 bactérias e dentre essas, 12 bactérias apresentaram atividade antimicrobiana, resultando em 13,63% de bactérias produtoras. Assim como no trabalho de Iseppi e colaboradores (2019) que isolou apenas bactérias lácticas oriundas de peixes e frutos do mar. Das 116 bactérias isoladas, um total de 16 bactérias (13,79%) foram detectadas como produtoras de substâncias

antimicrobianas. Esses trabalhos mostram o quanto os ambientes selecionados, para essa tese, são promissores para a bioprospecção de substâncias antimicrobianas.

Em relação a busca por gêneros específicos de estudo, as amostras coletadas na Lagoa Rodrigo de Freitas (RJ) e nos peixes *Mugil brasiliensis* e *Caranx latus* teve como objetivo isolar bactérias do gênero *Aeromonas*, sendo possível encontrar diversas estirpes para o gênero *Aeromonas*, um total de 57. Já no Rio São Benedito (PA), ao realizar a busca por bactérias do gênero *Aeromonas* pela técnica de metagenômica *shotgun* foi possível detectar uma quantidade pequena de leituras, sendo: 3-20 leituras para as amostras oriundas dos peixes *S. rhombeus* e de 7-26 leituras para as amostras de água do Rio São Benedito, mostrando que houve uma maior quantidade nas amostras de água. Ao isolar as bactérias oriundas dos cinco indivíduos do peixe da espécie *S. rhombeus* não foi possível isolar bactérias do gênero *Aeromonas*, pelo uso do meio seletivo GSP. Sendo assim, o número de bactérias do gênero *Aeromonas* foi inferior ao encontrado nos peixes *Mugil brasiliensis* e *Caranx latus* e nas amostras de água da Lagoa Rodrigo de Freitas (RJ). Apesar das bactérias do gênero *Aeromonas* não serem detectadas em grande quantidade nos metagenomas de água do Rio São Benedito e peixes da espécie *Serrasalmus rhombeus*, outros gêneros foram mais abundantes, mostrando que esses outros gêneros são importantes para a manutenção do ambiente, como também possuem alto potencial de produção de bacteriocinas.

Por meio de análises de bancada foi possível verificar que ambos os ambientes de água, a Lagoa Rodrigo de Freitas (RJ) e Rio São Benedito (PA), e os peixes (*Mugil brasiliensis*, *Caranx latus* e *Serrasalmus rhombeus*) possuem bactérias produtoras de substâncias antimicrobianas. Além das análises de bancada, foi realizada a associação das abordagens ômicas para buscar sequências relacionadas à produção de substâncias antimicrobianas. No genoma da estirpe *Aeromonas allosaccharophila* AE59-TE2 foi possível encontrar diversas sequências relevantes, incluindo quatro sequências gênicas homólogas à bacteriocina, zoocina A, que normalmente é isolada da bactéria *Streptococcus equi* e também foi possível encontrar um gene com 98% de identidade com o gene *cypA* que está relacionado com a produção da bacteriocina colicina V, isolada da bactéria *Escherichia coli*. Já no capítulo 3, onde foi analisada a cultura mista 38-XC4, contendo os genomas das bactérias *Aeromonas salmonicida* AE38-XC4 e *Acinetobacter pittii* ACP38-XC4, foi possível encontrar diversas sequências relacionadas com a

produção de substâncias antimicrobianas. Para o genoma *Acinetobacter pittii* ACP38-XC4 foi possível encontrar 3 sequências com identidades entre 36 – 35% e para o genoma da *Aeromonas salmonicida* AE38-XC4 foram encontradas quatro sequências com identidades entre 50% - 35% com a sequência proteica de produção da bacteriocina zoocina A.

Além desses achados, nos capítulos 2 e 3, ao analisar os metagenomas oriundos das quatro amostras de água do Rio São Benedito e dos cinco metagenomas da região ânus dos peixes espécie *S. rhombeus* também foi possível encontrar diversas sequências relacionadas à bacteriocina, como: linocina, colisticina, lactococina e zoocina A, as quais estão bastante difundidas nos metagenomas da região ânus dos peixes. Já nos metagenomas de água do Rio São Benedito, apenas dois metagenomas apresentaram sequências relacionadas à produção de bacteriocinas, sendo as sequências relacionadas à produção de linocina e zoocina A. Ao comparar os metagenomas oriundos de amostras de água do Rio São Benedito e os cinco metagenomas oriundos da região ânus dos peixes da espécie *S. rhombeus*, pode-se verificar que as amostras de peixes possuem mais sequências relacionadas a produção de substâncias antimicrobianas, do que em relação às amostras de água. Isso pode ocorrer devido a região investigada dos peixes ser uma região mais propícia às interações bacterianas, podendo haver competição por recursos, como o espaço e nutriente, fazendo com que algumas bactérias produzam substâncias ativas contra outras bactérias, como mencionado por Perez, Zendo & Sonomoto (2022).

Compilando todos os resultados encontrados nesta tese em relação à bioprospecção de substâncias antimicrobianas, pode-se observar que as bacteriocinas estão muito difundidas nos ambientes aquáticos, como também nos peixes. Sendo que a bacteriocina semelhante à zoocina A é a mais encontrada em ambos os ambientes (amostras de peixes e águas), mostrando o quanto é válido realizar avanços nos estudos com essas bacteriocinas.

Realizar a busca por novas substâncias antimicrobianas é fundamental, pois essas poderão ser utilizadas em indústrias alimentícias e farmacêuticas, auxiliando em um ponto importante na sociedade, resolvendo o problema de saúde pública no tratamento de doenças causadas por bactérias multirresistente a diversos antibióticos. Sendo assim, com todos os resultados obtidos nessa tese, pode-se concluir que realizar a bioprospecção de substâncias antimicrobianas em ambiente aquático proporciona uma gama de substâncias

com potencial biotecnológico e que os peixes concentram mais essas bactérias, sendo possível encontrar diversas estirpes produtoras de substâncias antimicrobianas. Dentre todas as bactérias produtoras apresentadas nessa tese, foi possível detectar produtoras de substâncias capazes de inibir bactérias patogênicas, algumas pertencentes ao grupo ESKAPE, as quais possuem resistência a antimicrobianos. Como *Klebsiella pneumoniae* KPC, *Klebsiella pneumoniae* ESBL, *Pseudomonas aeruginosa* SPM e também *Escherichia coli* ESBL e *Acinetobacter baumannii*. Além disso, realizar a bioprospecção *in silico*, pelo uso da bioinformática com as ômicas foi fundamental para avaliar o potencial de produção de substâncias antimicrobianas e chegar a resultados de forma mais rápida e precisa. Pode-se verificar que a bacteriocina semelhante à zoocina A é bastante difundida em ambientes aquáticos e peixes e que é possível encontrar diversas bacteriocinas, como: lactocina, linocina, closticina e zoocina difundidas entre as bactérias de ambiente aquático.

*Referências
Bibliográficas*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abushaheen MA, Muzaheed, Fatani AJ, Alosaimi M, Mansy W, George M, Acharya S, Rathod S, Divakar DD, Jhugroo C, Vellappally S, Khan AA, Shaik J, Jhugroo P. Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. **Dis Mon.** 2020 Jun;66(6):100971. doi: 10.1016/j.disamonth.2020.100971. Epub 2020 Mar 20. PMID: 32201008.
2. Águas do Rio. Águas do Rio apoia projeto de revitalização ambiental da Lagoa Rodrigo de Freitas. 2021. Site: <https://aguasdoriorio.com.br/aguas-do-rio-financia-projeto-de-revitalizacao-ambiental-da-lagoa-rodrigo-de-freitas/>. Acesso em: 13/04/2023.
3. Ahmad A, Hamid R, Dada AC, Usup G. *Pseudomonas putida* Strain FStm2 Isolated from Shark Skin: A Potential Source of Bacteriocin. **Probiotics Antimicrob Proteins.** 2013 Sep;5(3):165-75. doi: 10.1007/s12602-013-9140-4. PMID: 26782985.
4. Aires CAM, Pereira PS, Rocha-de-Souza CM, Silveira MC, Carvalho-Assef APD, Asensi MD. Population Structure of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolated from *Surveillance* Rectal Swabs in Brazil. **Microb Drug Resist.** 2020 Jun;26(6):652-660. doi: 10.1089/mdr.2019.0166. Epub 2019 Dec 17. PMID: 31851584.
5. Alcock BP, Raphenya AR, Lau TTY, Tsang KK, Bouchard M, Edalatmand A, Huynh W, Nguyen AV, Cheng AA, Liu S, Min SY, Miroshnichenko A, Tran HK, Werfalli RE, Nasir JA, Oloni M, Speicher DJ, Florescu A, Singh B, Faltyn M, Hernandez-Koutoucheva A, Sharma AN, Bordeleau E, Pawlowski AC, Zubyk HL, Dooley D, Griffiths E, Maguire F, Winsor GL, Beiko RG, Brinkman FSL, Hsiao WWL, Domselaar GV, McArthur AG. CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. **Nucleic Acids Res.** 2020 Jan 8;48(D1):D517-D525. doi: 10.1093/nar/gkz935. PMID: 31665441; PMCID: PMC7145624.
6. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol.** 1990 Oct 5;215(3):403-10. doi: 10.1016/S0022-

- 2836(05)80360-2. PMID: 2231712. Software: Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia. BLAST. Versão 2.11.0, 2021. Software de computador.
7. Alvarez-Sieiro P, Montalbán-López M, Mu D, Kuipers OP. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. **Appl Microbiol Biotechnol**. 2016 Apr;100(7):2939-51. doi: 10.1007/s00253-016-7343-9. Epub 2016 Feb 10. PMID: 26860942; PMCID: PMC4786598.
 8. Andrews, S. 2010. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
 9. Anuj SA, Gajera HP, Hirpara DG, Golakiya BA. Interruption in membrane permeability of drug-resistant *Staphylococcus aureus* with cationic particles of nano-silver. **Eur J Pharm Sci**. 2019 Jan 15;127:208-216. doi: 10.1016/j.ejps.2018.11.005. Epub 2018 Nov 7. PMID: 30412770.
 10. Apostolopoulos V, Bojarska J, Chai TT, Elnagdy S, Kaczmarek K, Matsoukas J, New R, Parang K, Lopez OP, Parhiz H, Perera CO, Pickholz M, Remko M, Saviano M, Skwarczynski M, Tang Y, Wolf WM, Yoshiya T, Zabrocki J, Zielenkiewicz P, AlKhazindar M, Barriga V, Kelaidonis K, Sarasia EM, Toth I. A Global Review on Short Peptides: Frontiers and Perspectives. **Molecules**. 2021 Jan 15;26(2):430. doi: 10.3390/molecules26020430. PMID: 33467522; PMCID: PMC7830668.
 11. Araújo FA, Barh D, Silva A, Guimarães L, Ramos RTJ. GO FEAT: a rapid web-based functional annotation tool for genomic and transcriptomic data. **Sci Rep**. 2018 Jan 29;8(1):1794. doi: 10.1038/s41598-018-20211-9. PMID: 29379090; PMCID: PMC5789007.
 12. Armstrong BD, Herfst CA, Tonial NC, Wakabayashi AT, Zeppa JJ, McCormick JK. Identification of a two-component Class IIb bacteriocin in *Streptococcus pyogenes* by recombinase-based in vivo expression technology. **Sci Rep**. 2016 Nov 3;6:36233. doi: 10.1038/srep36233. PMID: 27808235; PMCID: PMC5093712.
 13. Ateba TP, Alayande KA, Mwanza M. Feces Metagenomes and Metagenome-Assembled Genome Sequences from Two Separate Dogs (*Canis lupus familiaris*) with Multiple Diarrheal Episodes. **Microbiol Resour Announc**. 2020 Nov 25;9(48):e01065-20. doi: 10.1128/MRA.01065-20. PMID: 33239463; PMCID: PMC7686421.

14. Auch AF, von Jan M, Klenk HP, Göker M. Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. **Stand Genomic Sci.** 2010 Jan 28;2(1):117-34. doi: 10.4056/sigs.531120. PMID: 21304684; PMCID: PMC3035253.
15. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (Eds.). 1997. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc, New Jersey, USA.
16. Ayukekbong JA, Ntemgwa M, Atabe AN. The threat of antimicrobial resistance in developing countries: causes and control strategies. **Antimicrob Resist Infect Control.** 2017 May 15;6:47.
17. Bahar AA, Ren D. Antimicrobial peptides. **Pharmaceuticals (Basel).** 2013 Nov 28;6(12):1543-75. doi: 10.3390/ph6121543. PMID: 24287494; PMCID: PMC3873676.
18. Balandin SV, Sheremeteva EV, Ovchinnikova TV. Pediocin-Like Antimicrobial Peptides of Bacteria. **Biochemistry (Mosc).** 2019 May;84(5):464-478. doi: 10.1134/S000629791905002X. PMID: 31234762.
19. Balciunas EM, Castillo Martinez FA, Todorov SD, Franco BDGM, Converti A, Oliveira RPS. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. **Food Control.** 2013 32:(1):134-142. doi:10.1016/j.foodcont.2012.11.025
20. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **J Comput Biol.** 2012 May;19(5):455-77. doi: 10.1089/cmb.2012.0021. Epub 2012 Apr 16. PMID: 22506599; PMCID: PMC3342519.
21. Baptista, MGF. 2013. Mecanismos de Resistência aos Antibióticos. Dissertação (Mestrado - Curso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia. Lisboa.
22. Barbour A, Philip K. Variable characteristics of bacteriocin-producing *Streptococcus salivarius* strains isolated from Malaysian subjects. **PLoS One.** 2014 Jun 18;9(6):e100541. doi: 10.1371/journal.pone.0100541. PMID: 24941127; PMCID: PMC4062538.
23. Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Luzon MA, Wisplinghoff H, Rodríguez-Valera F. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of

- clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*. 2005 Sep;43(9):4382-90. doi: 10.1128/JCM.43.9.4382-4390.2005. **Erratum in: J Clin Microbiol**. 2007 Jun;45(6):2101. PMID: 16145081; PMCID: PMC1234098.
24. Bates S, Roscoe RA, Althorpe NJ, Brammar WJ, Wilkins BM. Expression of leading region genes on IncI1 plasmid Collb-P9: genetic evidence for single-stranded DNA transcription. *Microbiology (Reading)*. 1999 Oct;145 (Pt 10):2655-62. doi: 10.1099/00221287-145-10-2655. PMID: 10537187.
25. Bayramoglu B, Toubiana D, van Vliet S, Inglis RF, Shnerb N, Gillor O. Bet-hedging in bacteriocin producing *Escherichia coli* populations: the single cell perspective. *Sci Rep*. 2017 Feb 6;7:42068. doi: 10.1038/srep42068. PMID: 28165017; PMCID: PMC5292716.
26. Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2015 Jan;13(1):42-51. doi: 10.1038/nrmicro3380. Epub 2014 Dec 1. PMID: 25435309.
27. Blin K, Shaw S, Kloosterman AM, Charlop-Powers Z, van Wezel GP, Medema MH, Weber T. antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic Acids Res*. 2021 Jul 2;49(W1):W29-W35. doi: 10.1093/nar/gkab335. PMID: 33978755; PMCID: PMC8262755.
28. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014 Aug 1;30(15):2114-20. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170. Epub 2014 Apr 1. PMID: 24695404; PMCID: PMC4103590.
29. Bondi M, Messi P, Guerrieri E, Bitonte F. Virulence profiles and other biological characters in water isolated *Aeromonas hydrophila*. *New Microbiol*. 2000 Oct;23(4):347-56. PMID: 11061623.
30. Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, Philippon A, Allesoe RL, Rebelo AR, Florensa AF, Fagelhauer L, Chakraborty T, Neumann B, Werner G, Bender JK, Stingl K, Nguyen M, Coppens J, Xavier BB, Malhotra-Kumar S, Westh H, Pinholt M, Anjum MF, Duggett NA, Kempf I, Nykäsenoja S, Olkkola S, Wiczorek K, Amaro A, Clemente L, Mossong J, Losch S, Ragimbeau C, Lund O, Aarestrup FM. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from

- genotypes. **J Antimicrob Chemother.** 2020 Dec 1;75(12):3491-3500. doi: 10.1093/jac/dkaa345. PMID: 32780112; PMCID: PMC7662176.
31. Bosi E, Donati B, Galardini M, Brunetti S, Sagot MF, Lió P, Crescenzi P, Fani R, Fondi M. MeDuSa: a multi-draft based scaffolder. **Bioinformatics.** 2015 Aug 1;31(15):2443-51. doi: 10.1093/bioinformatics/btv171. Epub 2015 Mar 25. PMID: 25810435.
 32. Breitwieser FP, Lu J, Salzberg SL. A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly. **Brief Bioinform.** 2019 Jul 19;20(4):1125-1136. doi: 10.1093/bib/bbx120. PMID: 29028872; PMCID: PMC6781581.
 33. Breton-Deval L, Sanchez-Reyes A, Sanchez-Flores A, Juárez K, Salinas-Peralta I, Mussali-Galante P. Functional Analysis of a Polluted River Microbiome Reveals a Metabolic Potential for Bioremediation. **Microorganisms.** 2020 Apr 12;8(4):554. doi: 10.3390/microorganisms8040554. PMID: 32290598; PMCID: PMC7232204.
 34. Brettin, T., J. J. Davis, T. Disz, R. A. Edwards, S. Gerdes, G. J. Olsen, R. Olson, R. Overbeek, B. Parrello, G. D. Pusch, M. Shukla, J. A. Thomason, 3rd, R. Stevens, V. Vonstein, A. R. Wattam and F. Xia. RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. **Sci Rep.** 2015. 5: 8365. PMID: 25666585. PMCID: PMC4322359.
 35. Bruno ME, Montville TJ. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic Acid bacteria. **Appl Environ Microbiol.** 1993 Sep;59(9):3003-10. doi: 10.1128/aem.59.9.3003-3010.1993. PMID: 16349044; PMCID: PMC182399.
 36. Bunnoy A, Na-Nakorn U, Kayansamruaj P, Srisapoome P. *Acinetobacter* Strain KUO11TH, a Unique Organism Related to *Acinetobacter pittii* and Isolated from the Skin Mucus of Healthy Bighead Catfish and Its Efficacy Against Several Fish Pathogens. **Microorganisms.** 2019 Nov 10;7(11):549. doi: 10.3390/microorganisms7110549. PMID: 31717696; PMCID: PMC6920915.
 37. Burns J, McCoy CP, Irwin NJ. Synergistic activity of weak organic acids against uropathogens. **J Hosp Infect.** 2021 May;111:78-88. doi: 10.1016/j.jhin.2021.01.024. Epub 2021 Feb 3. PMID: 33545217.

38. Cabral AB, Melo, RDEC; Maciel MA, Lopes AC. 2012. Multidrug resistance genes, including blaKPC and blaCTX-M-2, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil; **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**; 45:5:572-578.
39. Cao Y, Naseri M, He Y, Xu C, Walsh LJ, Ziora ZM. Non-antibiotic antimicrobial agents to combat biofilm-forming bacteria. **J Glob Antimicrob Resist.** 2020 Jun;21:445-451. doi: 10.1016/j.jgar.2019.11.012. Epub 2019 Dec 10. PMID: 31830536.
40. Carattoli A, Hasman H. PlasmidFinder and In Silico pMLST: Identification and Typing of Plasmid Replicons in Whole-Genome Sequencing (WGS). **Methods Mol Biol.** 2020;2075:285-294. doi: 10.1007/978-1-4939-9877-7_20. PMID: 31584170.
41. Carvalheira A, Silva J, Teixeira P. *Acinetobacter* spp. in food and drinking water - A review. **Food Microbiol.** 2021 May;95:103675. doi: 10.1016/j.fm.2020.103675. Epub 2020 Nov 7. PMID: 33397609
42. Cascales E, Buchanan SK, Duché D, Kleanthous C, Llobès R, Postle K, Riley M, Slatin S, Cavard D. Colicin biology. **Microbiol Mol Biol Rev.** 2007 Mar;71(1):158-229. doi: 10.1128/MMBR.00036-06. PMID: 17347522; PMCID: PMC1847374.
43. Chaillou S, Stamou PE, Torres LL, Riesco AB, Hazelton W, Pinheiro VB. Directed evolution of colE1 plasmid replication compatibility: a fast tractable tunable model for investigating biological orthogonality. **Nucleic Acids Res.** 2022 Sep 9;50(16):9568-9579. doi: 10.1093/nar/gkac682. PMID: 36018798; PMCID: PMC9458437.
44. Chakraborty K, Kizhakkekalam VK, Joy M, Chakraborty RD. Bacillibactin class of siderophore antibiotics from a marine symbiotic *Bacillus* as promising antibacterial agents. **Appl Microbiol Biotechnol.** 2022 Jan;106(1):329-340. doi: 10.1007/s00253-021-11632-0. Epub 2021 Dec 16. PMID: 34913995.
45. Chen Y, Simmonds RS, Young JK, Timkovich R. Solution structure of the recombinant target recognition domain of zoocin A. **Proteins.** 2013 Apr;81(4):722-7. doi: 10.1002/prot.24224. Epub 2013 Jan 15. PMID: 23184858.

46. Christoff AP, Genômica e sequenciamento de nova geração. In Turchetto-Zolet AC, Turchetto C, Zanella CM, Passaia G. (organizadores). Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações. Ribeirão Preto: **Sociedade Brasileira de Genética**, 2017. 181 p. ISBN 978-85-89265-26-3.
47. Cimermancic P, Medema MH, Claesen J, Kurita K, Wieland Brown LC, Mavrommatis K, Pati A, Godfrey PA, Koehrsen M, Clardy J, Birren BW, Takano E, Sali A, Lington RG, Fischbach MA. Insights into secondary metabolism from a global analysis of prokaryotic biosynthetic gene clusters. **Cell**. 2014 Jul 17;158(2):412-421. doi: 10.1016/j.cell.2014.06.034. PMID: 25036635; PMCID: PMC4123684.
48. Cole JN, Nizet V. Bacterial Evasion of Host Antimicrobial Peptide Defenses. **Microbiol Spectr**. 2016 Feb;4(1):10.1128/microbiolspec.VMBF-0006-2015. doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0006-2015. PMID: 26999396; PMCID: PMC4804471.
49. Colston SM, Fullmer MS, Beka L, Lamy B, Gogarten JP, Graf J. Bioinformatic genome comparisons for taxonomic and phylogenetic assignments using *Aeromonas* as a test case. **mBio**. 2014 Nov 18;5(6):e02136. doi: 10.1128/mBio.02136-14. PMID: 25406383; PMCID: PMC4251997.
50. Conceição CSD, Souza BV, Vieira JM, Nascimento JDS. Pathogen killing pathogen: antimicrobial substance from *Acinetobacter* active against foodborne pathogens. **J Infect Dev Ctries**. 2018 May 31;12(5):297-304. doi: 10.3855/jidc.9894. PMID: 31865290.
51. Costa ALP & Silva-Junior CS. 2017. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura; **Científica UNIFAP** 7:2:45-57.
52. Costa SS, Lago LAB, Silva A, Graças DAD, Lameira J, Baraúna RA. Diversity of bacteriocins in the microbiome of the Tucuruí Hydroelectric Power Plant water reservoir and three-dimensional structure prediction of a zoocin. **Genet Mol Biol**. 2022 Jan 5;45(1):e20210204. doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2021-0204. PMID: 35037933; PMCID: PMC8762718.
53. Cotter PD, Hill C, Ross RP. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nat Rev Microbiol**. 2005 Oct;3(10):777-88. doi: 10.1038/nrmicro1273. PMID: 16205711.

54. Craft KM, Nguyen JM, Berg LJ, Townsend SD. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): antibiotic-resistance and the biofilm phenotype. **Medchemcomm**. 2019 Mar 14;10(8):1231-1241. doi: 10.1039/c9md00044e. PMID: 31534648; PMCID: PMC6748282.
55. Crawford MA, Lowe DE, Fisher DJ, Stibitz S, Plaut RD, Beaber JW, Zemansky J, Mehrad B, Glomski IJ, Strieter RM, Hughes MA. Identification of the bacterial protein FtsX as a unique target of chemokine-mediated antimicrobial activity against *Bacillus anthracis*. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2011 Oct 11;108(41):17159-64. doi: 10.1073/pnas.1108495108. Epub 2011 Sep 26. PMID: 21949405; PMCID: PMC3193227.
56. Dahal, Ram Hari; Nguyen, Tuan Manh; Pandey, Ramesh Prasad; Yamaguchi, Tokutaro; Sohng, Jae Kyung; Noh, Jongsung; Myung, Seung-Woon; Kim, Jaisoo (2020). The genome insights of *Streptomyces lannensis* T1317-0309 reveals actinomycin D production. **The Journal of Antibiotics**, (), -. doi:10.1038/s41429-020-0343-0.
57. Danecek P, Bonfield JK, Liddle J, Marshall J, Ohan V, Pollard MO, Whitwham A, Keane T, McCarthy SA, Davies RM, Li H. Twelve years of SAMtools and BCFtools. **Gigascience**. 2021 Feb 16;10(2):giab008. doi: 10.1093/gigascience/giab008. PMID: 33590861; PMCID: PMC7931819.
58. Database for Hydrological Time Series of Inland Waters (DAHITI); Deutsches Geodätisches Forschungsinstitut; Technische Universität München. Sítio eletrônico: <https://dahiti.dgfi.tum.de/en/10176/>. Data do último acesso em 23.01.2023.
59. Davis JJ, Wattam AR, Aziz RK, Brettin T, Butler R, Butler RM, Chlenski P, Conrad N, Dickerman A, Dietrich EM, Gabbard JL, Gerdes S, Guard A, Kenyon RW, Machi D, Mao C, Murphy-Olson D, Nguyen M, Nordberg EK, Olsen GJ, Olson RD, Overbeek JC, Overbeek R, Parrello B, Pusch GD, Shukla M, Thomas C, VanOeffelen M, Vonstein V, Warren AS, Xia F, Xie D, Yoo H, Stevens R. The PATRIC Bioinformatics Resource Center: expanding data and analysis capabilities. **Nucleic Acids Res**. 2020 Jan 8;48(D1):D606-D612. doi: 10.1093/nar/gkz943. PMID: 31667520. PMCID: PMC7145515.

60. De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, Harris PNA, Schembri MA, Beatson SA, Paterson DL, Walker MJ. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **Clin Microbiol Rev.** 2020 May 13;33(3):e00181-19. doi: 10.1128/CMR.00181-19. PMID: 32404435; PMCID: PMC7227449.
61. Desriac F, Jégou C, Balnois E, Brillet B, Le Chevalier P, Fleury Y. Antimicrobial peptides from marine proteobacteria. **Mar Drugs.** 2013 Sep 30;11(10):3632-60. doi: 10.3390/md11103632. PMID: 24084784; PMCID: PMC3826127.
62. Dimopoulou A, Theologidis I, Benaki D, Koukounia M, Zervakou A, Tzima A, Diallinas G, Hatzinikolaou DG, Skandalis N. Direct Antibiotic Activity of Bacillibactin Broadens the Biocontrol Range of *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600. **mSphere.** 2021 Aug 25;6(4):e0037621. doi: 10.1128/mSphere.00376-21. Epub 2021 Aug 11. PMID: 34378986; PMCID: PMC8386435.
63. Doblaz PC, Louro ID. GENÔMICA E OS SEQUENCIADORES DE PRÓXIMA GERAÇÃO in Avanços metodológicos em biologia molecular e biotecnologia / Organizadores Anderson Barros Archanjo, Aline Ribeiro Borçoi, Suzanny Oliveira Mendes, *et al.* – Ponta Grossa - PR: Atena, 2021.
64. Dougan G, Crosa JH, Falkow S. Mobilization of the Escherichia coli plasmid ColE1 (colicin E1) and ColE1 vectors used in recombinant DNA experiments. **J Infect Dis.** 1978 May;137(5):676-80. doi: 10.1093/infdis/137.5.676. PMID: 351085.
65. Drider D & Rebuffat S. 2011. Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications; **Springer** 1:4419-7692.
66. Duarte B, Figueiredo A, Ramalhosa P, Canning-Clode J, Caçador I, Fonseca VF. Unravelling the Portuguese Coastal and Transitional Waters' Microbial Resistome as a Biomarker of Differential Anthropogenic Impact. **Toxics.** 2022 Oct 15;10(10):613. doi: 10.3390/toxics10100613. PMID: 36287893; PMCID: PMC9612280.
67. Dugenci SK & Candan A. 2003. Isolation of *Aeromonas* sp. strains from the intestinal flora of atlantic *Salmon* (*Salmo solar* L. 1758) turk. **J Vet. Anim. Sci.** 2003 27:(5):5:1071-1075.

68. Duquesne S, Destoumieux-Garzón D, Peduzzi J, Rebuffat S. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. **Nat Prod Rep.** 2007 Aug;24(4):708-34. doi: 10.1039/b516237h. Epub 2007 Apr 18. PMID: 17653356.
69. Effah CY, Sun T, Liu S, Wu Y. *Klebsiella pneumoniae*: an increasing threat to public health. **Ann Clin Microbiol Antimicrob.** 2020 Jan 9;19(1):1. doi: 10.1186/s12941-019-0343-8. PMID: 31918737; PMCID: PMC7050612.
70. Egan K, Field D, Ross RP, Cotter PD, Hill C. In silico Prediction and Exploration of Potential Bacteriocin Gene Clusters Within the Bacterial Genus *Geobacillus*. **Front Microbiol.** 2018 Sep 20;9:2116. doi: 10.3389/fmicb.2018.02116. PMID: 30298056; PMCID: PMC6160750.
71. Egerton S, Culloty S, Whooley J, Stanton C, Ross RP. The Gut Microbiota of Marine Fish. **Front Microbiol.** 2018 May 4;9:873. doi: 10.3389/fmicb.2018.00873. PMID: 29780377; PMCID: PMC5946678.
72. Eguchi JY. Ativos antimicrobianos utilizados na indústria; **Revista Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação**; 2:22:35-39; 2007.
73. Eickhoff MJ, Bassler BL. *Vibrio fischeri* siderophore production drives competitive exclusion during dual-species growth. **Mol Microbiol.** 2020 Aug;114(2):244-261. doi: 10.1111/mmi.14509. Epub 2020 May 8. PMID: 32259318; PMCID: PMC7541421.
74. El-Gamal MI, Brahim I, Hisham N, Aladdin R, Mohammed H, Bahaaeldin A. Recent updates of carbapenem antibiotics. **Eur J Med Chem.** 2017 May 5;131:185-195. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.03.022. Epub 2017 Mar 16. PMID: 28324783.
75. Eyler RF, Shvets K. Clinical Pharmacology of Antibiotics. **Clin J Am Soc Nephrol.** 2019 Jul 5;14(7):1080-1090. doi: 10.2215/CJN.08140718. Epub 2019 Mar 12. PMID: 30862698; PMCID: PMC6625637.
76. Fazle Rabbee M, Baek KH. Antimicrobial Activities of Lipopeptides and Polyketides of *Bacillus velezensis* for Agricultural Applications. **Molecules.** 2020 Oct 27;25(21):4973. doi: 10.3390/molecules25214973. PMID: 33121115; PMCID: PMC7662345.
77. Feldgarden M, Brover V, Gonzalez-Escalona N, Frye JG, Haendiges J, Haft DH, Hoffmann M, Pettengill JB, Prasad AB, Tillman GE, Tyson GH, Klimke W.

- AMRFinderPlus and the Reference Gene Catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress response, and virulence. **Sci Rep.** 2021 Jun 16;11(1):12728. doi: 10.1038/s41598-021-91456-0. PMID: 34135355; PMCID: PMC8208984.
78. Fernández-Bravo A, Figueras MJ. An Update on the Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Epidemiology, and Pathogenicity. **Microorganisms.** 2020 Jan 17;8(1):129. doi: 10.3390/microorganisms8010129. PMID: 31963469; PMCID: PMC7022790.
79. Fira D, Dimkić I, Berić T, Lozo J, Stanković S. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. **J Biotechnol.** 2018 Nov 10;285:44-55. doi: 10.1016/j.jbiotec.2018.07.044. Epub 2018 Aug 30. PMID: 30172784.
80. Foster TJ. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. **FEMS Microbiol Rev.** 2017 May 1;41(3):430-449. doi: 10.1093/femsre/fux007. PMID: 28419231.
81. Fotso Techeu UD, Kaktcham PM, Momo HK, Foko Kouam EM, Tchamani Piame L, Ngouenam RJ, Zambou Ngoufack F. Isolation, Characterization, and Effect on Biofilm Formation of Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis* F01 Isolated from *Cyprinus carpio* and Application for Biopreservation of Fish Sausage. **Biomed Res Int.** 2022 Nov 22;2022:8437926. doi: 10.1155/2022/8437926. PMID: 36457342; PMCID: PMC9708341.
82. Gaddy JA, Arivett BA, McConnell MJ, López-Rojas R, Pachón J, Actis LA. Role of acinetobactin-mediated iron acquisition functions in the interaction of *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606T with human lung epithelial cells, *Galleria mellonella* caterpillars, and mice. **Infect Immun.** 2012 Mar;80(3):1015-24. doi: 10.1128/IAI.06279-11. Epub 2012 Jan 9. PMID: 22232188; PMCID: PMC3294665.
83. Galperin MY, Wolf YI, Makarova KS, Vera Alvarez R, Landsman D, Koonin EV. COG database update: focus on microbial diversity, model organisms, and widespread pathogens. **Nucleic Acids Res.** 2021 Jan 8;49(D1):D274-D281. doi: 10.1093/nar/gkaa1018. PMID: 33167031; PMCID: PMC7778934.
84. Gargis SR, Gargis AS, Heath HE, Heath LS, LeBlanc PA, Senn MM, Berger-Bächli B, Simmonds RS, Sloan GL. Zif, the zoocin A immunity factor, is a

- FemABX-like immunity protein with a novel mode of action. **Appl Environ Microbiol.** 2009 Oct;75(19):6205-10. doi: 10.1128/AEM.01011-09. Epub 2009 Aug 14. PMID: 19684178; PMCID: PMC2753078.
85. Ghai R, Rodriguez-Valera F, McMahon KD, Toyama D, Rinke R, Cristina Souza de Oliveira T, Wagner Garcia J, Pellon de Miranda F, Henrique-Silva F. Metagenomics of the water column in the pristine upper course of the Amazon river. **PLoS One.** 2011;6(8):e23785. doi: 10.1371/journal.pone.0023785. Epub 2011 Aug 19. Erratum in: PLoS One. 2014;9(5):e97393. PMID: 21915244; PMCID: PMC3158796.
86. Ghanbari, M., Kneifel, W., and Domig, K. J. (2015). A new view of the fish gut microbiome: advances from next-generation sequencing. **Aquaculture** 448, 464–475. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.06.033
87. Ghosh C, Sarkar P, Issa R, Haldar J. Alternatives to Conventional Antibiotics in the Era of Antimicrobial Resistance. **Trends Microbiol.** 2019 Apr;27(4):323-338. doi: 10.1016/j.tim.2018.12.010. Epub 2019 Jan 22. PMID: 30683453.
88. Ghosh S, Sarangi AN, Mukherjee M, Singh D, Madhavi M, Tripathy S. Reconstructing Draft Genomes Using Genome Resolved Metagenomics Reveal Arsenic Metabolizing Genes and Secondary Metabolites in Fresh Water Lake in Eastern India. **Bioinform Biol Insights.** 2021 Jun 22;15:11779322211025332. doi: 10.1177/11779322211025332. PMID: 34220198; PMCID: PMC8221699.
89. Ghrairi T, Braiek OB, Hani K. Detection and characterization of a bacteriocin, putadycin T01, produced by *Pseudomonas putida* isolated from hot spring water. **APMIS.** 2015 Mar;123(3):260-8. doi: 10.1111/apm.12343. Epub 2014 Dec 31. PMID: 25556393.
90. Giambiagi-Marval M, Mafra MA, Penido EG, Bastos MC. Distinct groups of plasmids correlated with bacteriocin production in *Staphylococcus aureus*. **J Gen Microbiol.** 1990 Aug;136(8):1591-9. doi: 10.1099/00221287-136-8-1591. PMID: 2175767.
91. Gibson L., Woodworth J., George A. Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*. **Aquaculture.** 1998;169:111–120. doi: 10.1016/S0044-8486(98)00369-X

92. Gibson LF. Bacteriocin activity and probiotic activity of *Aeromonas media*. **J Appl Microbiol**. 1998 Dec;85 Suppl 1:243S-248S. doi: 10.1111/j.1365-2672.1998.tb05304.x. PMID: 21182714.
93. Gillor O, Etzion A, Riley MA. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. **J Appl Microbiol Biotechnol**. 2008 Dec;81(4):591-606. doi: 10.1007/s00253-008-1726-5. Epub 2008 Oct 14. PMID: 18853155; PMCID: PMC2670069.
94. Gillor O, Giladi I, Riley MA. Persistence of colicinogenic *Escherichia coli* in the mouse gastrointestinal tract. **BMC Microbiol**. 2009 Aug 12;9:165. doi: 10.1186/1471-2180-9-165. PMID: 19674447; PMCID: PMC2741469.
95. Gonçalves Pessoa RB, de Oliveira WF, Marques DSC, Dos Santos Correia MT, de Carvalho EMMM, Coelho LCBB. The genus *Aeromonas*: A general approach. **Microb Pathog**. 2019 May;130:81-94. doi: 10.1016/j.micpath.2019.02.036. Epub 2019 Mar 5. PMID: 30849490.
96. González García M, Rodríguez A, Alba A, Vázquez AA, Morales Vicente FE, Pérez-Erviti J, Spellerberg B, Stenger S, Grieshaber M, Conzelmann C, Münch J, Raber H, Kubiczek D, Rosenau F, Wiese S, Ständker L, Otero-González A. New Antibacterial Peptides from the Freshwater Mollusk *Pomacea poeyana* (Pilsbry, 1927). **Biomolecules**. 2020 Oct 23;10(11):1473. doi: 10.3390/biom10111473. PMID: 33113998; PMCID: PMC7690686.
97. Gonzalez-Avila LU, Loyola-Cruz MA, Hernández-Cortez C, Bello-López JM, Castro-Escarpulli G. Colistin Resistance in *Aeromonas* spp. **Int J Mol Sci**. 2021 Jun 1;22(11):5974. doi: 10.3390/ijms22115974. PMID: 34205867; PMCID: PMC8199210.
98. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. **Nat Rev Genet**. 2016 May 17;17(6):333-51. doi: 10.1038/nrg.2016.49. PMID: 27184599.
99. Grant JR, Stothard P. The CGView Server: a comparative genomics tool for circular genomes. **Nucleic Acids Res**. 2008 Jul 1;36(Web Server issue):W181-4. doi: 10.1093/nar/gkn179. Epub 2008 Apr 14. PMID: 18411202; PMCID: PMC2447734.

100. Gratia A. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de coïl bacille. **CR Seances Soc. Biol. Fil.** 1925; 93:1040–1041.
101. Guimarães DO, Momesso LS, Pupo MT. 2010. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quimica Nova** 33:3:667-679.
102. Guo Y, Song G, Sun M, Wang J, Wang Y. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Front Cell Infect Microbiol.** 2020 Mar 17;10:107. doi: 10.3389/fcimb.2020.00107. PMID: 32257966; PMCID: PMC7089872.
103. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. **Bioinformatics.** 2013 Apr 15;29(8):1072-5. doi: 10.1093/bioinformatics/btt086. Epub 2013 Feb 19. PMID: 23422339; PMCID: PMC3624806.
104. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp Ser.** 1999 41;41(1):95-98. doi: <https://doi.org/citeulike-article-id:691774>.
105. Hammami R, Zouhir A, Le Lay C, Ben Hamida J, Fliss I. BACTIBASE second release: a database and tool platform for bacteriocin characterization. **BMC Microbiol.** 2010 Jan 27;10:22. doi: 10.1186/1471-2180-10-22. PMID: 20105292; PMCID: PMC2824694.
106. Hatha M, Vivekanandhan AA, Joice GJ, Christol. Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water fish. **Int J Food Microbiol.** 2005 Feb 1;98(2):131-4. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.017. PMID: 15747443.
107. Heath LS, Heath HE, LeBlanc PA, Smithberg SR, Dufour M, Simmonds RS, Sloan GL. The streptococcolytic enzyme zoocin A is a penicillin-binding protein. **FEMS Microbiol Lett.** 2004 Jul 15;236(2):205-11. doi: 10.1016/j.femsle.2004.05.038. PMID: 15251198.
108. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. **Genomics.** 2016 Jan;107(1):1-8. doi: 10.1016/j.ygeno.2015.11.003. Epub 2015 Nov 10. PMID: 26554401; PMCID: PMC4727787.
109. Heilbronner S, Krismer B, Brötz-Oesterhelt H, Peschel A. The microbiome-shaping roles of bacteriocins. **Nat Rev Microbiol.** 2021 Nov;19(11):726-739. doi: 10.1038/s41579-021-00569-w. Epub 2021 Jun 1. PMID: 34075213.

110. Hemeg HA. Nanomaterials for alternative antibacterial therapy. **Int J Nanomedicine**. 2017 Nov 10;12:8211-8225. doi: 10.2147/IJN.S132163. PMID: 29184409; PMCID: PMC5689025.
111. Holo H, Nilssen O, Nes IF. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. **J Bacteriol**. 1991 Jun;173(12):3879-87. doi: 10.1128/jb.173.12.3879-3887.1991. PMID: 1904860; PMCID: PMC208020.
112. Hols P, Ledesma-García L, Gabant P, Mignolet J. Mobilization of Microbiota Commensals and Their Bacteriocins for Therapeutics. **Trends Microbiol**. 2019 Aug;27(8):690-702. doi: 10.1016/j.tim.2019.03.007. Epub 2019 Apr 12. PMID: 30987817.
113. Howland CJ, Rees CE, Barth PT, Wilkins BM. The *ssb* gene of plasmid ColIb-P9. **J Bacteriol**. 1989 May;171(5):2466-73. doi: 10.1128/jb.171.5.2466-2473.1989. PMID: 2651402; PMCID: PMC209922.
114. Hudson MA, Lockless SW. Elucidating the Mechanisms of Action of Antimicrobial Agents. **mBio**. 2022 Jun 28;13(3):e0224021. doi: 10.1128/mbio.02240-21. Epub 2022 Apr 18. PMID: 35435702; PMCID: PMC9239108.
115. Huigens RW 3rd, Abouelhassan Y, Yang H. Phenazine Antibiotic-Inspired Discovery of Bacterial Biofilm-Eradicating Agents. **Chembiochem**. 2019 Dec 2;20(23):2885-2902. doi: 10.1002/cbic.201900116. Epub 2019 Oct 2. PMID: 30811834; PMCID: PMC7325843.
116. Hurst A. Nisin. **Advances Appl. Microbiol**. 1981 27:85-123. doi:10.1016/s0065-2164(08)70342-3
117. Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future. **Curr Opin Microbiol**. 2019 Oct;51:72-80. doi: 10.1016/j.mib.2019.10.008. Epub 2019 Nov 13. PMID: 31733401.
118. Hwang S, Lee N, Cho S, Palsson B, Cho BK. Repurposing Modular Polyketide Synthases and Non-ribosomal Peptide Synthetases for Novel Chemical Biosynthesis. **Front Mol Biosci**. 2020 May 15;7:87. doi: 10.3389/fmolb.2020.00087. PMID: 32500080; PMCID: PMC7242659.

119. Hyatt D, Chen GL, Locascio PF, Land ML, Larimer FW, Hauser LJ. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. **BMC Bioinformatics**. 2010 Mar 8;11:119. doi: 10.1186/1471-2105-11-119. PMID: 20211023; PMCID: PMC2848648.
120. Ibrahim S, Al-Saryi N, Al-Kadmy IMS, Aziz SN. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as an emerging concern in hospitals. **Mol Biol Rep**. 2021 Oct;48(10):6987-6998. doi: 10.1007/s11033-021-06690-6. Epub 2021 Aug 30. PMID: 34460060; PMCID: PMC8403534.
121. Ichikawa N, Sasagawa M, Yamamoto M, Komaki H, Yoshida Y, Yamazaki S, Fujita N. DoBISCUIT: a database of secondary metabolite biosynthetic gene clusters. **Nucleic Acids Res**. 2013 Jan;41(Database issue):D408-14. doi: 10.1093/nar/gks1177. Epub 2012 Nov 26. PMID: 23185043; PMCID: PMC3531092.
122. Iseppi R, Stefani S, de Niederhausern S, Bondi M, Sabia C, Messi P. Characterization of Anti-*Listeria monocytogenes* Properties of two Bacteriocin-Producing *Enterococcus mundtii* Isolated from Fresh Fish and Seafood. **Curr Microbiol**. 2019 Sep;76(9):1010-1019. doi: 10.1007/s00284-019-01716-6. Epub 2019 Jun 10. PMID: 31183517.
123. Janda JM, Abbott SL. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. **Clin Microbiol Rev**. 2010 Jan;23(1):35-73. doi: 10.1128/CMR.00039-09. PMID: 20065325; PMCID: PMC2806660.
124. Jaremko MJ, Davis TD, Corpuz JC, Burkart MD. Type II non-ribosomal peptide synthetase proteins: structure, mechanism, and protein-protein interactions. **Nat Prod Rep**. 2020 Mar 25;37(3):355-379. doi: 10.1039/c9np00047j. PMID: 31593192; PMCID: PMC7101270.
125. Jujjavarapu SE, Dhagat S. In Silico Discovery of Novel Ligands for Antimicrobial Lipopeptides for Computer-Aided Drug Design. **Probiotics Antimicrob Proteins**. 2018 Jun;10(2):129-141. doi: 10.1007/s12602-017-9356-9. PMID: 29218506.
126. Jung Y, Matthews KR. Potential transfer of extended spectrum β -lactamase encoding gene, *blashv18* gene, between *Klebsiella pneumoniae* in raw foods.

- Food Microbiol.** 2016 Dec;60:39-48. doi: 10.1016/j.fm.2016.06.002. Epub 2016 Jun 8. PMID: 27554144.
127. Kanehisa M, Sato Y. KEGG Mapper for inferring cellular functions from protein sequences. **Protein Sci.** 2020 Jan;29(1):28-35. doi: 10.1002/pro.3711. Epub 2019 Aug 29. PMID: 31423653; PMCID: PMC6933857.
128. Kang DD, Li F, Kirton E, Thomas A, Egan R, An H, Wang Z. MetaBAT 2: an adaptive binning algorithm for robust and efficient genome reconstruction from metagenome assemblies. **PeerJ.** 2019 Jul 26;7:e7359. doi: 10.7717/peerj.7359. PMID: 31388474; PMCID: PMC6662567.
129. Keegan KP, Glass EM, Meyer F. MG-RAST, a Metagenomics Service for Analysis of Microbial Community Structure and Function. **Methods Mol Biol.** 2016;1399:207-33. doi: 10.1007/978-1-4939-3369-3_13. PMID: 26791506.
130. Kemperman R, Kuipers A, Karsens H, Nauta A, Kuipers O, Kok J. Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. **Appl Environ Microbiol.** 2003 Mar;69(3):1589-97. doi: 10.1128/AEM.69.3.1589-1597.2003. PMID: 12620847; PMCID: PMC150056.
131. Kessler N, Schuhmann H, Morneweg S, Linne U, Marahiel MA. The linear pentadecapeptide gramicidin is assembled by four multimodular nonribosomal peptide synthetases that comprise 16 modules with 56 catalytic domains. **J Biol Chem.** 2004 Feb 27;279(9):7413-9. doi: 10.1074/jbc.M309658200. Epub 2003 Dec 11. PMID: 14670971.
132. Khan R, Takahashi E, Nakura H, Ansaruzzaman M, Banik S, Ramamurthy T, Okamoto K. Toxin production by *Aeromonas sobria* in natural environments: river water vs. seawater. **Acta Med Okayama.** 2008 Dec;62(6):363-71. doi: 10.18926/AMO/30947. PMID: 19122681.
133. Khoshnood S, Heidary M, Asadi A, Soleimani S, Motahar M, Savari M, Saki M, Abdi M. A review on mechanism of action, resistance, synergism, and clinical implications of mupirocin against *Staphylococcus aureus*. **Biomed Pharmacother.** 2019 Jan;109:1809-1818. doi: 10.1016/j.biopha.2018.10.131. Epub 2018 Nov 26. PMID: 30551435.
134. Kim SK, Guevarra RB, Kim YT, Kwon J, Kim H, Cho JH, Kim HB, Lee JH. Role of Probiotics in Human Gut Microbiome-Associated Diseases. **J Microbiol**

- Biotechnol. 2019 Sep 28;29(9):1335-1340. doi: 10.4014/jmb.1906.06064. PMID: 31434172.
135. Kime L, Randall CP, Banda FI, Coll F, Wright J, Richardson J, Empel J, Parkhill J, O'Neill AJ. Transient Silencing of Antibiotic Resistance by Mutation Represents a Significant Potential Source of Unanticipated Therapeutic Failure. **mBio**. 2019 Oct 29;10(5):e01755-19. doi: 10.1128/mBio.01755-19. PMID: 31662453; PMCID: PMC6819657.
136. Kirov SM. The public health significance of *Aeromonas* spp. in foods. **Int J Food Microbiol**. 1993 Dec;20(4):179-98. doi: 10.1016/0168-1605(93)90164-c. PMID: 8110597.
137. Klaenhammer TR. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol Rev**. 1993 Sep;12(1-3):39-85. doi: 10.1111/j.1574-6976.1993.tb00012.x. PMID: 8398217.
138. Kleanthous C. Swimming against the tide: progress and challenges in our understanding of colicin translocation. **Nat Rev Microbiol**. 2010 Dec;8(12):843-8. doi: 10.1038/nrmicro2454. Epub 2010 Nov 9. PMID: 21060316.
139. Klein EY, Mojica N, Jiang W, Cosgrove SE, Septimus E, Morgan DJ, Laxminarayan R. Trends in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Hospitalizations in the United States, 2010-2014. **Clin Infect Dis**. 2017 Nov 13;65(11):1921-1923. doi: 10.1093/cid/cix640. PMID: 29020322.
140. Klimko CP, Welkos SL, Shoe JL, Mou S, Hunter M, Rill NO, DeShazer D, Cote CK. Efficacy of Treatment with the Antibiotic Novobiocin against Infection with *Bacillus anthracis* or *Burkholderia pseudomallei*. **Antibiotics (Basel)**. 2022 Nov 23;11(12):1685. doi: 10.3390/antibiotics11121685. PMID: 36551342; PMCID: PMC9774170.
141. Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. **Nat Rev Microbiol**. 2010 Jun;8(6):423-35. doi: 10.1038/nrmicro2333. Epub 2010 May 4. PMID: 20440275; PMCID: PMC2896384.
142. Kumar SV, Taylor G, Hasim S, Collier CP, Farmer AT, Campagna SR, Bible AN, Doktycz MJ, Morrell-Falvey J. Loss of carotenoids from membranes of *Pantoea* sp. YR343 results in altered lipid composition and changes in membrane biophysical properties. **Biochim Biophys Acta Biomembr**. 2019 Jul

- 1;1861(7):1338-1345. doi: 10.1016/j.bbamem.2019.05.009. Epub 2019 May 14. PMID: 31095944.
143. Kumariya R, Garsa AK, Rajput YS, Sood SK, Akhtar N, Patel S. Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. **Microb Pathog.** 2019 Mar;128:171-177. doi: 10.1016/j.micpath.2019.01.002. Epub 2019 Jan 3. PMID: 30610901.
144. Lai AC, Tran S, Simmonds RS. Functional characterization of domains found within a lytic enzyme produced by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. **FEMS Microbiol Lett.** 2002 Sep 24;215(1):133-8. doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11382.x. PMID: 12393213.
145. Lai CKC, Ng RWY, Leung SSY, Hui M, Ip M. Overcoming the rising incidence and evolving mechanisms of antibiotic resistance by novel drug delivery approaches - An overview. **Adv Drug Deliv Rev.** 2022 Feb;181:114078. doi: 10.1016/j.addr.2021.114078. Epub 2021 Dec 9. PMID: 34896131.
146. Lancaster LE, Wintermeyer W, Rodnina MV. Colicins and their potential in cancer treatment. **Blood Cells Mol Dis.** 2007 Jan-Feb;38(1):15-8. doi: 10.1016/j.bcmd.2006.10.006. Epub 2006 Nov 28. PMID: 17134920.
147. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nat Methods.** 2012 Mar 4;9(4):357-9. doi: 10.1038/nmeth.1923. PMID: 22388286; PMCID: PMC3322381.
148. Lapenda JC, Silva PA, Vicalvi MC, Sena KX, Nascimento SC. Antimicrobial activity of prodigiosin isolated from *Serratia marcescens* UFPEDA 398. **World J Microbiol Biotechnol.** 2015 Feb;31(2):399-406. doi: 10.1007/s11274-014-1793-y. Epub 2014 Dec 31. PMID: 25549906.
149. Lategan MJ, Gibson LF. Antagonistic activity of *Aeromonas media* strain A199 against *Saprolegnia* sp., an opportunistic pathogen of the eel, *Anguilla australis* Richardson. **J Fish Dis.** 2003 Mar;26(3):147-53. doi: 10.1046/j.1365-2761.2003.00443.x. PMID: 12962224
150. Lauzon HL, Gudmundsdottir S, Petursdottir SK, Reynisson E, Steinarsson A, Oddgeirsson M, Bjornsdottir R, Gudmundsdottir BK. Microbiota of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) rearing systems at pre- and posthatch stages and the effect of

- different treatments. **J Appl Microbiol.** 2010 Nov;109(5):1775-89. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04806.x. Epub 2010 Jul 21. PMID: 20662972.
- 151.Li C, Pan D, Li M, Wang Y, Song L, Yu D, Zuo Y, Wang K, Liu Y, Wei Z, Lu Z, Zhu L, Shen X. Aerobactin-Mediated Iron Acquisition Enhances Biofilm Formation, Oxidative Stress Resistance, and Virulence of *Yersinia pseudotuberculosis*. **Front Microbiol.** 2021 Jul 15;12:699913. doi: 10.3389/fmicb.2021.699913. PMID: 34335534; PMCID: PMC8319957.
- 152.Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics.** 2010 Mar 1;26(5):589-95. doi: 10.1093/bioinformatics/btp698. Epub 2010 Jan 15. PMID: 20080505; PMCID: PMC2828108.
- 153.Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. **Bioinformatics.** 2009 Aug 15;25(16):2078-9. doi: 10.1093/bioinformatics/btp352. Epub 2009 Jun 8. PMID: 19505943; PMCID: PMC2723002.
- 154.Li MF, Zhang BC, Li J, Sun L. Sil: a *Streptococcus iniae* bacteriocin with dual role as an antimicrobial and an immunomodulator that inhibits innate immune response and promotes *S. iniae* infection. **PLoS One.** 2014 Apr 29;9(4):e96222. doi: 10.1371/journal.pone.0096222. PMID: 24781647; PMCID: PMC4004548.
- 155.Lima LM, Silva BNMD, Barbosa G, Barreiro EJ. β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. **Eur J Med Chem.** 2020 Dec 15;208:112829. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112829. Epub 2020 Sep 16. PMID: 33002736.
- 156.Liu B, Zheng D, Jin Q, Chen L, Yang J. VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. **Nucleic Acids Res.** 2019 Jan 8;47(D1):D687-D692. doi: 10.1093/nar/gky1080. PMID: 30395255; PMCID: PMC6324032.
- 157.Logares R, Bråte J, Heinrich F, Shalchian-Tabrizi K, Bertilsson S. Infrequent transitions between saline and fresh waters in one of the most abundant microbial lineages (SAR11). **Mol Biol Evol.** 2010 Feb;27(2):347-57. doi: 10.1093/molbev/msp239. Epub 2009 Oct 6. PMID: 19808864.

- 158.Loureiro RJ, Roque F, Rodrigues AT, Herdeiro MT, Ramalheira E. 2016. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução; **Revista Portuguesa de Saúde Pública**; 113:8.
- 159.Lozupone CA, Knight R. Global patterns in bacterial diversity. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2007 Jul 3;104(27):11436-40. doi: 10.1073/pnas.0611525104. Epub 2007 Jun 25. PMID: 17592124; PMCID: PMC2040916.
- 160.Lüthje P, von Kückritz-Blickwede M, Schwarz S. Identification and characterization of nine novel types of small staphylococcal plasmids carrying the lincosamide nucleotidyltransferase gene *lnu(A)*. **J Antimicrob Chemother**. 2007 Apr;59(4):600-6. doi: 10.1093/jac/dkm008. Epub 2007 Feb 28. PMID: 17329268.
- 161.Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 2004. Microbiologia de Brock 10.ed.
- 162.Magnani, M. Levantamento da Flora e Fauna da Lagoa Rodrigo de Freitas. **Ambiente Brasil**. 2004 Site: https://ambientes.ambientebrasil.com.br/agua/artigos_agua doce/levantamento da flora e fauna da lagoa rodrigo de freitas.html. Acesso em: 13/04/2023.
- 163.Mahlapu M, Håkansson J, Ringstad L, Björn C. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. **Front Cell Infect Microbiol**. 2016 Dec 27;6:194. doi: 10.3389/fcimb.2016.00194. PMID: 28083516; PMCID: PMC5186781.
- 164.Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. **Microbiome**. 2015 Jul 30;3:31. doi: 10.1186/s40168-015-0094-5. PMID: 26229597; PMCID: PMC4520061.
- 165.Marinho HRP, Peronico ULO, Kocerginsky PO. 2016. Resistência bacteriana: uma revisão da literatura. **Temas em saúde** 16:4:122-128.
- 166.Matsunaga N. [*Acinetobacter* spp]. **Nihon Rinsho**. 2012 Feb;70(2):236-42. Japanese. PMID: 22413524.
- 167.Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. **Proc Natl Acad Sci USA**. 1977 Feb;74(2):560-4. doi: 10.1073/pnas.74.2.560. PMID: 265521; PMCID: PMC392330.
- 168.McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. **PLoS One**. 2013 Apr 22;8(4):e61217. doi: 10.1371/journal.pone.0061217. PMID: 23630581; PMCID: PMC3632530.

169. 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 Res** 39:339–346.
170. Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk HP, Göker M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. **BMC Bioinformatics**. 2013 Feb 21;14:60. doi: 10.1186/1471-2105-14-60. PMID: 23432962; PMCID: PMC3665452.
171. Melo VV, Duarte IP, Soares AQ. Guia Antimicrobianos; 1.ed. Goiânia; 2012.
172. Merck KGaA, GSP Agar (*Pseudomonas Aeromonas* Selective Agar Base) acc. to KIELWEIN. Medium proposed by KIELWEIN (1969, 1971) for detecting *Pseudomonas* and *Aeromonas* in foodstuffs as well as in wastewater and equipment of the food industry. 64271 Darmstadt, Germany. EMD Millipore Corporation, 290 Concord Road, Billerica, MA 01821, USA, 2008-08-26.
173. Merck KGaA, GSP Agar (*Pseudomonas Aeromonas* Selective Agar Base) acc. to KIELWEIN. Medium proposed by KIELWEIN (1969, 1971) for detecting *Pseudomonas* and *Aeromonas* in foodstuffs as well as in wastewater and equipment of the food industry. 64271 Darmstadt, Germany. EMD Millipore Corporation, 290 Concord Road, Billerica, MA 01821, USA, 2008-08-26.
174. Messi P, Guerrieri E, Bondi M. Bacteriocin-like substance (BLS) production in *Aeromonas hydrophila* water isolates. **FEMS Microbiol Lett**. 2003 Mar 14;220(1):121-5. doi: 10.1016/S0378-1097(03)00092-2. PMID: 12644237.
175. Migaw S, Ghrairi T, Belguesmia Y, Choiset Y, Berjeaud JM, Chobert JM, Hani K, Haertlé T. Diversity of bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated from Mediterranean fish viscera. **World J Microbiol Biotechnol**. 2014 Apr;30(4):1207-17. doi: 10.1007/s11274-013-1535-6. Epub 2013 Nov 5. PMID: 24189971.
176. Mikheenko A, Prjibelski A, Saveliev V, Antipov D, Gurevich A. Versatile genome assembly evaluation with QUASt-LG. **Bioinformatics**. 2018 Jul 1;34(13):i142-i150. doi: 10.1093/bioinformatics/bty266. PMID: 29949969; PMCID: PMC6022658.

177. Moriya Y, Itoh M, Okuda S, Yoshizawa AC, Kanehisa M. KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. **Nucleic Acids Res.** 2007 Jul;35(Web Server issue):W182-5. doi: 10.1093/nar/gkm321. Epub 2007 May 25. PMID: 17526522; PMCID: PMC1933193.
178. Moro EM, Weiss RD, Friedrich RS, Nunes MP. Bacteriocin-like substance of *Aeromonas hydrophila*. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 1997 Jan-Feb;92(1):115-6. doi: 10.1590/s0074-02761997000100024. PMID: 9302421.
179. Moscatelli, M.; Almeida, J R. Reflorestamento de manguezais da Lagoa Rodrigo de Freitas. **An. III Simp. Ecosist. Cost. Brasil.** 131-135, 1993.
180. Mühlberg E, Umstätter F, Kleist C, Domhan C, Mier W, Uhl P. Renaissance of vancomycin: approaches for breaking antibiotic resistance in multidrug-resistant bacteria. **Can J Microbiol.** 2020 Jan;66(1):11-16. doi: 10.1139/cjm-2019-0309. Epub 2019 Sep 23. PMID: 31545906.
181. Nawaz N, Wen S, Wang F, Nawaz S, Raza J, Iftikhar M, Usman M. Lysozyme and Its Application as Antibacterial Agent in Food Industry. **Molecules.** 2022 Sep 24;27(19):6305. doi: 10.3390/molecules27196305. PMID: 36234848; PMCID: PMC9572377.
182. Nayfach S, Shi ZJ, Seshadri R, Pollard KS, Kyrpides NC. New insights from uncultivated genomes of the global human gut microbiome. **Nature.** 2019 Apr;568(7753):505-510. doi: 10.1038/s41586-019-1058-x. Epub 2019 Mar 13. PMID: 30867587; PMCID: PMC6784871.
183. Newton RJ, Jones SE, Eiler A, McMahon KD, Bertilsson S. A guide to the natural history of freshwater lake bacteria. **Microbiol Mol Biol Rev.** 2011 Mar;75(1):14-49. doi: 10.1128/MMBR.00028-10. PMID: 21372319; PMCID: PMC3063352.
184. Nguyen VD, Pham TT, Nguyen TH, Nguyen TT, Hoj L. Screening of marine bacteria with bacteriocin-like activities and probiotic potential for ornate spiny lobster (*Panulirus ornatus*) juveniles. **Fish Shellfish Immunol.** 2014 Sep;40(1):49-60. doi: 10.1016/j.fsi.2014.06.017. Epub 2014 Jun 23. PMID: 24969424.
185. Nicolae Dopcea G, Dopcea I, Nanu AE, Diguță CF, Matei F. Resistance and cross-resistance in *Staphylococcus* spp. strains following prolonged exposure to

- different antiseptics. **J Glob Antimicrob Resist.** 2020 Jun;21:399-404. doi: 10.1016/j.jgar.2019.10.021. Epub 2019 Nov 4. PMID: 31698107.
186. O'Neill J. The Wellcome Trust and the UK Department of Health. Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations. Reino Unido, 2014.
187. O'Connor PM, Kuniyoshi TM, Oliveira RP, Hill C, Ross RP, Cotter PD. Antimicrobials for food and feed; a bacteriocin perspective. **Curr Opin Biotechnol.** 2020 Feb;61:160-167. doi: 10.1016/j.copbio.2019.12.023. Epub 2020 Jan 20. PMID: 31968296.
188. Okonechnikov K, Conesa A, García-Alcalde F. Qualimap 2: advanced multi-sample quality control for high-throughput sequencing data. **Bioinformatics.** 2016 Jan 15;32(2):292-4. doi: 10.1093/bioinformatics/btv566. Epub 2015 Oct 1. PMID: 26428292; PMCID: PMC4708105.
189. Oladipo AO, Oladipo OG, Bezuidenhout CC. Multi-drug resistance traits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcal* species from clinical and environmental sources. **J Water Health.** 2019 Dec;17(6):930-943. doi: 10.2166/wh.2019.177. PMID: 31850900.
190. OMS; Antimicrobial resistance Global Report on Surveillance; 2014, (http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1); último acesso: 14/11/2022.
191. Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Parrello B, Shukla M, Vonstein V, Wattam AR, Xia F, Stevens R. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). **Nucleic Acids Res.** 2014 Jan;42(Database issue):D206-14. doi: 10.1093/nar/gkt1226. Epub 2013 Nov 29. PMID: 24293654; PMCID: PMC3965101.
192. Pará Turismo, 2018. Sítio eletrônico www.paraturismo.pa.gov.br/pt-br/vejamaiz_pescaesportiva/rioazul_saobenedito. Data do último acesso em 23.01.2023.
193. Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. **Genome Res.** 2015 Jul;25(7):1043-55. doi:

- 10.1101/gr.186072.114. Epub 2015 May 14. PMID: 25977477; PMCID: PMC4484387.
194. Pereira WA, Piazzentin ACM, de Oliveira RC, Mendonça CMN, Tabata YA, Mendes MA, Fock RA, Makiyama EN, Corrêa B, Vallejo M, Villalobos EF, de S Oliveira RP. Bacteriocinogenic probiotic bacteria isolated from an aquatic environment inhibit the growth of food and fish pathogens. **Sci Rep**. 2022 Apr 1;12(1):5530. doi: 10.1038/s41598-022-09263-0. PMID: 35365686; PMCID: PMC8975912.
195. Perez RH, Zendo T, Sonomoto K. Multiple bacteriocin production in lactic acid bacteria. **J Biosci Bioeng**. 2022 Oct;134(4):277-287. doi: 10.1016/j.jbiosc.2022.07.007. Epub 2022 Aug 1. PMID: 35927130.
196. Pichereau S, Rose WE. Invasive community-associated MRSA infections: epidemiology and antimicrobial management. **Expert Opin Pharmacother**. 2010 Dec;11(18):3009-25. doi: 10.1517/14656566.2010.511614. Epub 2010 Oct 19. PMID: 20955116.
197. Plackett B. No money for new drugs. **Nat Outlook**. 2020 586:S50-S52.
198. Pond MJ, Stone DM, Alderman DJ. Comparison of conventional and molecular techniques to investigate the flora of rainbow trout (*Ncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**. 2006 261:(1):194-303. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.06
199. Prince A, Roy S, McDonald D. Exploration of the Antimicrobial Synergy between Selected Natural Substances on *Streptococcus mutans* to Identify Candidates for the Control of Dental Caries. **Microbiol Spectr**. 2022 Jun 29;10(3):e0235721. doi: 10.1128/spectrum.02357-21. Epub 2022 Apr 12. PMID:
200. Qi S, Gui M, Li H, Yu C, Li H, Zeng Z, Sun P. Secondary Metabolites from Marine Micromonospora: Chemistry and Bioactivities. **Chem Biodivers**. 2020 Apr;17(4):e2000024. doi: 10.1002/cbdv.202000024. Epub 2020 Mar 18. PMID: 32100940.
201. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing; R, Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2022; Available online: <https://www.R-project.org/> (Acessado em 08 de abril de 2023).
202. Radaic A, de Jesus MB, Kapila YL. Bacterial anti-microbial peptides and nano-sized drug delivery systems: The state of the art toward improved bacteriocins. J

- Control Release. 2020 May 10;321:100-118. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.02.001. Epub 2020 Feb 5. PMID: 32035192.
203. Raheem N, Straus SK. Mechanisms of Action for Antimicrobial Peptides With Antibacterial and Antibiofilm Functions. **Front Microbiol.** 2019 Dec 12;10:2866. doi: 10.3389/fmicb.2019.02866. PMID: 31921046; PMCID: PMC6927293.
204. Rebuffat S. Microcins in action: amazing defence strategies of *Enterobacteria*. **Biochem Soc Trans.** 2012 Dec 1;40(6):1456-62. doi: 10.1042/BST20120183. PMID: 23176498.
205. Reich M, Liefeld T, Gould J, Lerner J, Tamayo P, Mesirov JP. GenePattern 2.0. **Nat Genet.** 2006 May;38(5):500-1. doi: 10.1038/ng0506-500. PMID: 16642009.
206. Richter M, Rosselló-Móra R, Oliver Glöckner F, Peplies J. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. **Bioinformatics.** 2016 Mar 15;32(6):929-31. doi: 10.1093/bioinformatics/btv681. Epub 2015 Nov 16. PMID: 26576653; PMCID: PMC5939971.
207. Ricke SC. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. **Poult Sci.** 2003 Apr;82(4):632-9. doi: 10.1093/ps/82.4.632. PMID: 12710485.
208. Riley MA, Wertz JE. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. **Annu Rev Microbiol.** 2002;56:117-37. doi: 10.1146/annurev.micro.56.012302.161024. Epub 2002 Jan 30. PMID: 12142491.
209. Rodrigues, A E M. Lagoa Rodrigo de Freitas/RJ: História de uma ocupação desordenada. **Oecologia Australis**, v. 16, n. 3, p. 339–352, 2012.
210. Sáez-Llorens X, Castrejón de Wong MM, Castaño E, De Suman O, De Morös D, De Atencio I. Impact of an antibiotic restriction policy on hospital expenditures and bacterial susceptibilities: a lesson from a pediatric institution in a developing country. **Pediatr Infect Dis J.** 2000 Mar;19(3):200-6. doi: 10.1097/00006454-200003000-00005. PMID: 10749459.
211. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci USA.** 1977 Dec;74(12):5463-7. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463. PMID: 271968; PMCID: PMC431765.
212. Santala S, Santala V. *Acinetobacter baylyi* ADP1-naturally competent for synthetic biology. **Essays Biochem.** 2021 Jul 26;65(2):309-318. doi: 10.1042/EBC20200136. PMID: 33769448

213. Sarkar P, Bhunia AK, Yao Y. Impact of starch-based emulsions on the antibacterial efficacies of nisin and thymol in cantaloupe juice. **Food Chem.** 2017 Feb 15;217:155-162. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.08.071. Epub 2016 Aug 23. PMID: 27664621.
214. Sattely ES, Walsh CT. A latent oxazoline electrophile for N-O-C bond formation in pseudomonine biosynthesis. **J Am Chem Soc.** 2008 Sep 17;130(37):12282-4. doi: 10.1021/ja804499r. Epub 2008 Aug 19. PMID: 18710233.
215. Saxena P, Joshi Y, Rawat K, Bisht R. Biofilms: Architecture, Resistance, Quorum Sensing and Control Mechanisms. **Indian J Microbiol.** 2019 Mar;59(1):3-12. doi: 10.1007/s12088-018-0757-6. Epub 2018 Aug 21. PMID: 30728625; PMCID: PMC6328408.
216. Schalk IJ. Siderophore-antibiotic conjugates: exploiting iron uptake to deliver drugs into bacteria. **Clin Microbiol Infect.** 2018 Aug;24(8):801-802. doi: 10.1016/j.cmi.2018.03.037. Epub 2018 Apr 10. PMID: 29649600.p0.
217. Schulte RH, Munson E. *Staphylococcus aureus* Resistance Patterns in Wisconsin: 2018 Surveillance of Wisconsin Organisms for Trends in Antimicrobial Resistance and Epidemiology (SWOTARE) Program Report. **Clin Med Res.** 2019 Dec;17(3-4):72-81. doi: 10.3121/cmr.2019.1503. Epub 2019 Oct 3. PMID: 31582419; PMCID: PMC6886895.
218. Seemann T. Abricate, **GitHub** <https://github.com/tseemann/abricate>, 2020.
219. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics.** 2014 Jul 15;30(14):2068-9. doi: 10.1093/bioinformatics/btu153. Epub 2014 Mar 18. PMID: 24642063.
220. Seemann, T. barrnap 0.9: rapid ribosomal RNA prediction. <https://github.com/tseemann/barrnap> (2013).
221. Severinov K, Semenova E, Kazakov A, Kazakov T, Gelfand MS. Low-molecular-weight post-translationally modified microcins. **Mol Microbiol.** 2007 Sep;65(6):1380-94. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05874.x. Epub 2007 Aug 17. Erratum in: *Mol Microbiol.* 2007 Oct;66(1):277. PMID: 17711420.
222. Shyam M, Shilkar D, Rakshit G, Jayaprakash V. Approaches for targeting the mycobactin biosynthesis pathway for novel anti-tubercular drug discovery: where

- we stand. **Expert Opin Drug Discov.** 2022 Jul;17(7):699-715. doi: 10.1080/17460441.2022.2077328. Epub 2022 May 29. PMID: 35575503.
223. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD, Higgins DG. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Mol Syst Biol.** 2011 Oct 11;7:539. doi: 10.1038/msb.2011.75. PMID: 21988835; PMCID: PMC3261699.
224. Silva S. Bioprospecção de estirpes de *Aeromonas* produtoras de substâncias antimicrobianas e sequenciamento genômico das estirpes: *Aeromonas salmonicida* AE38 e *Aeromonas allosaccharophila* AE59. Rio de Janeiro, 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências – Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2018.
225. Silva SD, Guedes FAF, Amaral JRV, Ribeiro JRA, Souza YPA, Freitas-Almeida C, Thompson FL, Ramos RTJ, Whiteley AS, Macrae A, Oliveira SS. *Aeromonas allosaccharophila* Strain AE59-TE2 Is Highly Antagonistic towards Multidrug-Resistant Human Pathogens, What Does Its Genome Tell Us? **Life** (Basel). 2022 Sep 26;12(10):1492. doi: 10.3390/life12101492. PMID: 36294926; PMCID: PMC9605075.
226. Skinnider MA, Johnston CW, Edgar RE, Dejong CA, Merwin NJ, Rees PN, Magarvey NA. Genomic charting of ribosomally synthesized natural product chemical space facilitates targeted mining. **Proc Natl Acad Sci USA.** 2016 Oct 18;113(42):E6343-E6351. doi: 10.1073/pnas.1609014113. Epub 2016 Oct 3. PMID: 27698135; PMCID: PMC5081660.
227. Śmiałek J, Nowakowski M, Bzowska M, Bocheńska O, Wlizo A, Kozik A, Dubin G, Mak P. Structure, Biosynthesis, and Biological Activity of Succinylated Forms of Bacteriocin BacSp222. **Int J Mol Sci.** 2021 Jun 10;22(12):6256. doi: 10.3390/ijms22126256. PMID: 34200765; PMCID: PMC8230399.
228. Smith JL. The physiological role of ferritin-like compounds in bacteria. **Crit Rev Microbiol.** 2004;30(3):173-85. doi: 10.1080/10408410490435151. PMID: 15490969.

229. Soares, M F; Domingos, P.; Soares, F F L; Telles, L F R. 10 anos de monitoramento da qualidade ambiental das águas da lagoa Rodrigo de Freitas. **Oecologia Australis**, v. 16, n. 3, p. 581–614, 2012.
230. Sousa AM, Pereira MO, Lourenço A. MorphoCol: An ontology-based knowledgebase for the characterisation of clinically significant bacterial colony morphologies. **J Biomed Inform.** 2015 Jun;55:55-63. doi: 10.1016/j.jbi.2015.03.007. Epub 2015 Mar 25. PMID: 25817920.
231. Stincone P, Brandelli A. Marine bacteria as source of antimicrobial compounds. **Crit Rev Biotechnol.** 2020 May;40(3):306-319. doi: 10.1080/07388551.2019.1710457. Epub 2020 Jan 28. PMID: 31992085.
232. Stratev D, Odeyemi OA. Antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from different food sources: A mini-review. **J Infect Public Health.** 2016 Sep-Oct;9(5):535-44. doi: 10.1016/j.jiph.2015.10.006. Epub 2015 Nov 14. PMID: 26588876.
233. Sulthana R, Archer AC. Bacteriocin nanoconjugates: boon to medical and food industry. **J Appl Microbiol.** 2021 Sep;131(3):1056-1071. doi: 10.1111/jam.14982. Epub 2021 Jan 7. PMID: 33368869.
234. Sylvain FÉ, Holland A, Audet-Gilbert É, Luis Val A, Derome N. Amazon fish bacterial communities show structural convergence along widespread hydrochemical gradients. **Mol Ecol.** 2019 Aug;28(15):3612-3626. doi: 10.1111/mec.15184. Epub 2019 Aug 11. PMID: 31325401.
235. Tagg JR, McGiven AR. Assay system for bacteriocins. **Appl Microbiol.** 1971 May;21(5):943. doi: 10.1128/am.21.5.943-943.1971. PMID: 4930039; PMCID: PMC377313.
236. Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Mol Biol Evol.** 2021 Jun 25;38(7):3022-3027. doi: 10.1093/molbev/msab120. PMID: 33892491; PMCID: PMC8233496.
237. Tan GY, Peng Y, Lu C, Bai L, Zhong JJ. Engineering validamycin production by tandem deletion of γ -butyrolactone receptor genes in *Streptomyces hygroscopicus* 5008. **Metab Eng.** 2015 Mar; 28:74-81. doi: 10.1016/j.ymben.2014.12.003. Epub 2014 Dec 16. PMID: 25527439.

238. Tang L, Huang J, She J, Zhao K, Zhou Y. Co-Occurrence of the blaKPC-2 and Mcr-3.3 Gene in *Aeromonas caviae* SCAC2001 Isolated from Patients with Diarrheal Disease. **Infect Drug Resist.** 2020 May 25;13:1527-1536. doi: 10.2147/IDR.S245553. PMID: 32547122; PMCID: PMC7259443.
239. Tavares, W. 1990. Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos; Atheneu.
240. Teunisse, G. M. Fantaxtic - Nested Bar Plots for Phyloseq Data (Version 2.0.1) [Computer software]. 2022. <https://github.com/gmteunisse/Fantaxtic>
241. Thai Son N, Thu Huong VT, Kim Lien VT, Quynh Nga DT, Hai Au TT, Thu Hang PT, Nguyet Minh HT, Binh TQ. Antimicrobial Resistance Profile and Molecular Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolates from Hospitalized Adults in Three Regions of Vietnam. **Jpn J Infect Dis.** 2020 May 22;73(3):193-200. doi: 10.7883/yoken.JJID.2019.239. Epub 2019 Dec 25. PMID: 31875603.
242. Thomas T, Gilbert J, Meyer F. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. **Microb Inform Exp.** 2012 Feb 9;2(1):3. doi: 10.1186/2042-5783-2-3. PMID: 22587947; PMCID: PMC3351745.
243. Torres KAM, Lima SMRR, Torres LMB, Gamberini MT, Silva Junior PID. Garlic: An Alternative Treatment for Group B *Streptococcus*. **Microbiol Spectr.** 2021 Dec 22;9(3):e0017021. doi: 10.1128/Spectrum.00170-21. Epub 2021 Nov 24. PMID: 34817207; PMCID: PMC8612145.
244. Tracanna V, de Jong A, Medema MH, Kuipers OP. Mining prokaryotes for antimicrobial compounds: from diversity to function. **FEMS Microbiol Rev.** 2017 May 1;41(3):417-429. doi: 10.1093/femsre/fux014. PMID: 28402441.
245. Tyagi A, Singh B, Billekallu Thammegowda NK, Singh NK. Shotgun metagenomics offers novel insights into taxonomic compositions, metabolic pathways and antibiotic resistance genes in fish gut microbiome. **Arch Microbiol.** 2019 Apr;201(3):295-303. doi: 10.1007/s00203-018-1615-y. Epub 2019 Jan 2. PMID: 30604012.
246. UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. **Nucleic Acids Res.** 2021 Jan 8;49(D1):D480-D489. doi: 10.1093/nar/gkaa1100. PMID: 33237286; PMCID: PMC7778908.

247. Valdés-Stauber N, Scherer S. Isolation and characterization of Linocin M18, a bacteriocin produced by *Brevibacterium linens*. *Appl Environ Microbiol.* 1994 Oct;60(10):3809-14. doi: 10.1128/aem.60.10.3809-3814.1994. PMID: 7986050; PMCID: PMC201890.
248. Valdés-Stauber N, Scherer S. Nucleotide sequence and taxonomical distribution of the bacteriocin gene *lin* cloned from *Brevibacterium linens* M18. *Appl Environ Microbiol.* 1996 Apr;62(4):1283-6. doi: 10.1128/aem.62.4.1283-1286.1996. PMID: 8919789; PMCID: PMC167894.
249. Van der Sleen, A., & Albert, J. S. Field guide to the fishes of the Amazon. **Orinoco and Guianas: Oxford University Press.** 2018.
250. Van Heel AJ, de Jong A, Montalbán-López M, Kok J, Kuipers OP. BAGEL3: Automated identification of genes encoding bacteriocins and (non-) bactericidal post translationally modified peptides. **Nucleic Acids Res.** 2013 Jul;41(Web Server issue):W448-53. doi: 10.1093/nar/gkt391. Epub 2013 May 15. PMID: 23677608; PMCID: PMC3692055.
251. Vaz-Moreira I, Nunes OC, Manaia CM. Diversity and antibiotic resistance patterns of Sphingomonadaceae isolates from drinking water. **Appl Environ Microbiol.** 2011 Aug 15;77(16):5697-706. doi: 10.1128/AEM.00579-11. Epub 2011 Jun 24. PMID: 21705522; PMCID: PMC3165245.
252. Vermelho AB, Pereira A, Coelho R, Souto-Pradrón T. **Práticas de Microbiologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006 ISBN 85-277-1165-6, 239p.
253. Vidal Amaral, J.R.; Jucá Ramos, R.T.; Almeida Araújo, F.; Bentes Kato, R.; Figueira Aburjaile, F.; de Castro Soares, S.; Góes-Neto, A.; Matiuzzi da Costa, M.; Azevedo, V.; Brenig, B.; *et al.* Bacteriocin Producing *Streptococcus agalactiae* Strains Isolated from Bovine Mastitis in Brazil. **Microorganisms** 2022 , 10 , 588. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030588>
254. Vijayakumar S, Biswas I, Veeraraghavan B. Accurate identification of clinically important *Acinetobacter* spp.: an update. **Future Sci OA.** 2019 Jun 27;5(6):FSO395. doi: 10.2144/fsoa-2018-0127. PMID: 31285840; PMCID: PMC6609899.

255. Vila E, Hornero-Méndez D, Azziz G, Lareo C, Saravia V. Carotenoids from heterotrophic bacteria isolated from Fildes Peninsula, King George Island, Antarctica. **Biotechnol Rep (Amst)**. 2019 Jan 11;21:e00306. doi: 10.1016/j.btre.2019.e00306. PMID: 30705834; PMCID: PMC6348148.
256. Vosloo S, Huo L, Anderson CL, Dai Z, Sevillano M, Pinto A. Evaluating de Novo Assembly and Binning Strategies for Time Series Drinking Water Metagenomes. **Microbiol Spectr**. 2021 Dec 22;9(3):e0143421. doi: 10.1128/Spectrum.01434-21. Epub 2021 Nov 3. PMID: 34730411; PMCID: PMC8567270.
257. Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature**. 1953 Apr 25;171(4356):737-8. doi: 10.1038/171737a0. PMID: 13054692.
258. Weber T, Blin K, Duddela S, Krug D, Kim HU, Bruccoleri R, Lee SY, Fischbach MA, Müller R, Wohlleben W, Breitling R, Takano E, Medema MH. antiSMASH 3.0—a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. **Nucleic Acids Res**. 2015 Jul 1;43(W1):W237-43. doi: 10.1093/nar/gkv437. Epub 2015 May 6. PMID: 25948579; PMCID: PMC4489286.
259. Wijesinghe VN, Choo WS. Antimicrobial betalains. **J Appl Microbiol**. 2022 Dec;133(6):3347-3367. doi: 10.1111/jam.15798. Epub 2022 Sep 7. PMID: 36036373; PMCID: PMC9826318.
260. Wu CJ, Ko WC, Lee NY, Su SL, Li CW, Li MC, Chen YW, Su YC, Shu CY, Lin YT, Chen PL. *Aeromonas* Isolates from Fish and Patients in Tainan City, Taiwan: Genotypic and Phenotypic Characteristics. **Appl Environ Microbiol**. 2019 Oct 16;85(21):e01360-19. doi: 10.1128/AEM.01360-19. PMID: 31420346; PMCID: PMC6803315.
261. Wu YW, Simmons BA, Singer SW. MaxBin 2.0: an automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets. **Bioinformatics**. 2016 Feb 15;32(4):605-7. doi: 10.1093/bioinformatics/btv638. Epub 2015 Oct 29. PMID: 26515820.
262. Wu YW, Tang YH, Tringe SG, Simmons BA, Singer SW. MaxBin: an automated binning method to recover individual genomes from metagenomes using an

- expectation-maximization algorithm. **Microbiome**. 2014 Aug 1;2:26. doi: 10.1186/2049-2618-2-26. PMID: 25136443; PMCID: PMC4129434.
263. Wuest WM, Sattely ES, Walsh CT. Three siderophores from one bacterial enzymatic assembly line. **J Am Chem Soc**. 2009 Apr 15;131(14):5056-7. doi: 10.1021/ja900815w. PMID: 19320483; PMCID: PMC2676571.
264. Xu L, Dong Z, Fang L, Luo Y, Wei Z, Guo H, Zhang G, Gu YQ, Coleman-Derr D, Xia Q, Wang Y. OrthoVenn2: a web server for whole-genome comparison and annotation of orthologous clusters across multiple species. **Nucleic Acids Res**. 2019 Jul 2;47(W1):W52-W58. doi: 10.1093/nar/gkz333. PMID: 31053848; PMCID: PMC6602458.
265. Yamada K, Kaneko J, Kamio Y, Itoh Y. Binding sequences for RdgB, a DNA damage-responsive transcriptional activator, and temperature-dependent expression of bacteriocin and pectin lyase genes in *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. **Appl Environ Microbiol**. 2008 Oct;74(19):6017-25. doi: 10.1128/AEM.01297-08. Epub 2008 Aug 8. PMID: 18689515; PMCID: PMC2565958.
266. Yang JJ, Cheng A, Tai HM, Chang LW, Hsu MC, Sheng WH. Selected Mutations by Nemonoxacin and Fluoroquinolone Exposure Among Relevant Gram-Positive Bacterial Strains in Taiwan. **Microb Drug Resist**. 2020 Feb;26(2):110-117. doi: 10.1089/mdr.2019.0048. Epub 2019 Aug 30. PMID: 31478786.
267. Yang SC, Lin CH, Sung CT, Fang JY. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. **Front Microbiol**. 2014 May 26;5:241. doi: 10.3389/fmicb.2014.00241. Erratum in: *Front Microbiol*. 2014;5:683. PMID: 24904554; PMCID: PMC4033612.
268. Ye SH, Siddle KJ, Park DJ, Sabeti PC. Benchmarking Metagenomics Tools for Taxonomic Classification. **Cell**. 2019 Aug 8;178(4):779-794. doi: 10.1016/j.cell.2019.07.010. PMID: 31398336; PMCID: PMC6716367.
269. Yoon S, Lee YJ. Molecular characteristics of ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from chickens with colibacillosis. **J Vet Sci**. 2022 May;23(3):e37. doi: 10.4142/jvs.21105. Epub 2022 Feb 22. PMID: 35332711; PMCID: PMC9149503.
270. Zalegh I, Bourhia M, Zerouali K, Katfy K, Nayme K, Khallouki F, Benzaarate I, Mohammad Salamatullah A, Alzahrani A, Nafidi HA, Akssira M, Ait Mhand R.

Molecular Characterization of Gene-Mediated Resistance and Susceptibility of ESKAPE Clinical Isolates to *Cistus monspeliensis* L. and *Cistus salviifolius* L. Extracts. **Evid Based Complement Alternat Med.** 2022 Sep 27;2022:7467279. doi: 10.1155/2022/7467279. PMID: 36204117; PMCID: PMC9532067.

271. Zhao H, Shao D, Jiang C, Shi J, Li Q, Huang Q, Rajoka MSR, Yang H, Jin M. Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*. **Appl Microbiol Biotechnol.** 2017 Aug;101(15):5951-5960. doi: 10.1007/s00253-017-8396-0. Epub 2017 Jul 6. PMID: 28685194.

272. Zhu G, Wang Q, Lu S, Niu Y. Hydrogen Peroxide: A Potential Wound Therapeutic Target? **Med Princ Pract.** 2017;26(4):301-308. doi: 10.1159/000475501. Epub 2017 Apr 5. PMID: 28384636; PMCID: PMC5768111.

Apêndice

APÊNDICE

1- Introdução contendo os resultados da dissertação de Silva, 2018.

Assim como mencionado no prefácio desta tese, os resultados anteriores descritos na dissertação de Silva (2018) estão resumidos a seguir. Dentre as 57 bactérias isoladas de peixes de feira livre e a da lagoa Rodrigo de Freitas, 38 estirpes foram identificadas como produtoras de substâncias antimicrobianas (Tabela I - Apêndice) e todas foram identificadas preliminarmente por testes bioquímicos (Tabela II - Apêndice). Duas bactérias produtoras foram selecionadas para realizar o sequenciamento genômico. A estirpe AE59-TE2, apresentou um amplo espectro de ação contra diversas bactérias patogênicas, já a bactéria AE38 foi selecionada por apresentar um espectro de ação menor, inibindo os gêneros *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* que são espécies importantes por seu potencial virulência e resistência a antibióticos (Figura I - Apêndice). Após as análises, pode-se concluir que a estirpe AE38 foi identificada como uma cultura mista, sendo então renomeada de 38-XC4. Nesta tese foi possível aprofundar as análises realizadas no genoma da estirpe AE59-TE2, para buscar os genes que possam explicar a produção de substâncias antimicrobianas, buscar genes relacionados à virulência e fazer uma análise taxonômica mais profunda, adicionando a técnica *Multilocus sequence analysis* (MLSA). Para a cultura mista 38.XC4 o objetivo foi separar as duas bactérias *in silico*, através da técnica *Metagenome Assembled Genome* (MAG), para uma melhor análise dos dois genomas da cultura mista.

Tabela I - Apêndice: Tabela com as 38 estirpes de bactérias do gênero *Aeromonas* produtoras de substâncias antimicrobianas e suas respectivas identificações e local de isolamento. Retirada da dissertação de Silva, 2018.

Origem da coleta	Quantidade de Produtoras	Identificação das estirpes
Peixes de Feira livre	21	<i>A. salmonicida</i>
	5	<i>Aeromonas</i> sp.
	6	<i>A. caviae</i>
	4	<i>A. hydrophila</i>
Lagoa Rodrigo de Freitas	1	<i>A. salmonicida</i>
Alface	1	<i>A. caviae</i>

Tabela II - Apêndice: Estirpes produtoras de substâncias antimicrobianas. As estirpes em destaques (cinza) são as que foram sequenciadas. Retirada da dissertação de Silva, 2018.

Estirpe	Espécie	Origem
AE02 - C2	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Lagoa Rodrigo de Freitas
AE04 - P1	<i>Aeromonas caviae</i>	Lagoa Rodrigo de Freitas
AE06 - PIR1	<i>Aeromonas caviae</i>	Lagoa Rodrigo de Freitas
AE07 - PIR2	<i>Aeromonas caviae</i>	Lagoa Rodrigo de Freitas
AE08 - PIR3	<i>Aeromonas caviae</i>	Lagoa Rodrigo de Freitas
AE09 - REB	<i>Aeromonas caviae</i>	Lagoa Rodrigo de Freitas
AE10 - VP1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Lagoa Rodrigo de Freitas
AE11 - VP2	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Lagoa Rodrigo de Freitas
AE12 - VP3	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Lagoa Rodrigo de Freitas
AE16 - VS1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Lagoa Rodrigo de Freitas
AE18 - VS3	<i>Aeromonas caviae</i>	Lagoa Rodrigo de Freitas
AE24 - AC52	<i>Aeromonas caviae</i>	Alface
AE27 - TB1	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Peixe de Feira-livre
AE28 - TB2	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Peixe de Feira-livre
AE29 - TE1	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Peixe de Feira-livre
AE30 - TE4	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Peixe de Feira-livre
AE31 - TE5	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Peixe de Feira-livre
AE32 - TI1	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Peixe de Feira-livre
AE33 - TI3	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Peixe de Feira-livre
AE34 - TI4	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Peixe de Feira-livre
AE35 - TI5	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Peixe de Feira-livre
AE36 - XC2	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Peixe de Feira-livre
AE38/ 38 - XC4	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Peixe da espécie: <i>Caranx latus</i> (Xerelete) coletado de Feira-livre
AE39 - XC5	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Peixe de Feira-livre
AE40 - XC6	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Peixe de Feira-livre
AE41 - XC7	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Peixe de Feira-livre
AE42 - TC2	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Peixe de Feira-livre
AE43 - TC3	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Peixe de Feira-livre
AE44 - TC9	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Peixe de Feira-livre
AE45 - TC10	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Peixe de Feira-livre
AE46 - TC11	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Peixe de Feira-livre
AE48 - TC14	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Peixe de Feira-livre
AE49 - TC15	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Peixe de Feira-livre
AE53 - TC5	<i>Aeromonas sp.</i>	Peixe de Feira-livre
AE54 - TC6	<i>Aeromonas sp.</i>	Peixe de Feira-livre
AE56 - TC8	<i>Aeromonas sp.</i>	Peixe de Feira-livre
AE58 - TC3	<i>Aeromonas sp.</i>	Peixe de Feira-livre
AE59 - T2	<i>Aeromonas sp.</i>	Peixe da espécie: <i>Mugil brasiliensis</i> (Tainha) coletado de Feira-livre

A Figura I- Apêndice ilustra o teste de produção da substância antimicrobiana. A placa de Petri contém o meio de ágar nutriente e a bactéria indicadora neste teste foi uma

estirpe de *Klebsiella pneumoniae* ESBL e as estirpes testadas quanto à produção de substâncias antimicrobianas são do gênero *Aeromonas*.

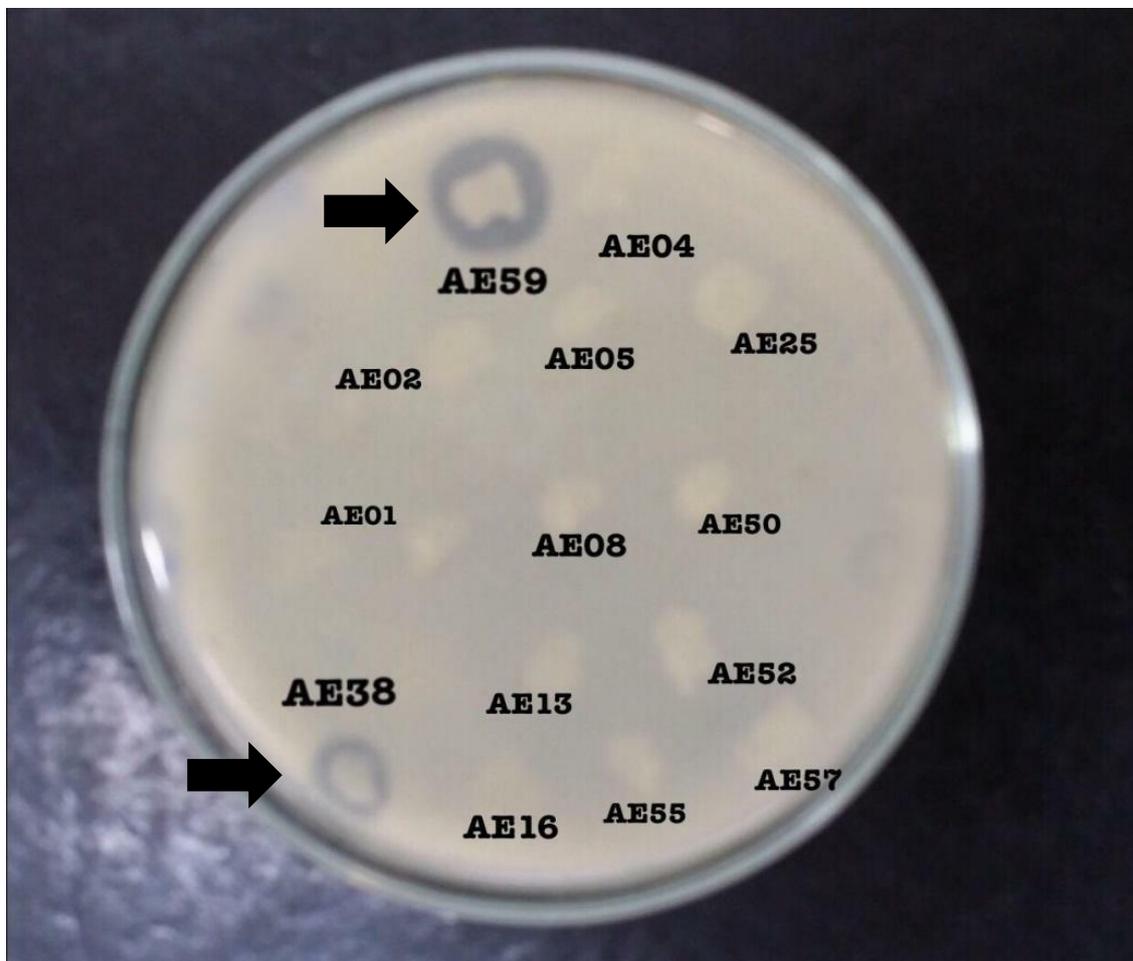


Figura I - Apêndice: Teste de detecção das substâncias antimicrobianas. As bactérias produtoras foram semeadas em forma de pontos em meio ágar nutriente. A bactéria indicadora utilizada foi: *Klebsiella pneumoniae* ESBL. A seta está mostrando o halo de inibição em volta do crescimento da estirpe AE59 e AE38 (38-XC4), onde o crescimento da estirpe *Klebsiella pneumoniae* ESBL foi inibido. Retirada da dissertação de Silva, 2018.

Para visualizar a morfologia da cultura mista 38-XC4, foi realizada a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), a seguir será apresentada a metodologia utilizada e a Figura II – Apêndice apresenta a morfologia das células.

A bactéria foi crescida em placa de Ágar GSP para confirmar a pureza da estirpe, através da coloração, como explicado anteriormente. Após as 48 horas de incubação, foi realizada uma suspensão da colônia em 100µl de salina e em seguida esta foi centrifugada a 6000 RPM por 2 minutos. As amostras foram fixadas com solução composta por: Glutaraldeído 2,5%, e tampão Cacodilato de Sódio 0,1 M durante uma hora e foi novamente centrifugada a 6000 RPM por 2 minutos. A lâmina foi tratada com Poli-L-lisina por 5 minutos e então a amostra foi depositada sobre a lâmina e manteve-a em repouso por 5 minutos. Foram realizadas três lavagens com o tampão Cacodilato de Sódio 0,1 M e na etapa de pós-fixação foi adicionada a solução de 2% Tetróxido de Ósmio com tampão Cacodilato de Sódio 0,1 M na proporção de 1:1 durante uma hora e novamente lavado por três vezes com o tampão Cacodilato de Sódio 0,1 M. A desidratação foi realizada gradualmente através de aplicações de etanol nos volumes de 30%, 50%, 70%, 90% e com três aplicações no volume de 100% para garantir a remoção completa da água, todas as imersões ocorreram no tempo de 15 minutos. Para secar a amostra foi utilizado o aparelho de ponto crítico da marca BAI-TEC CPD 030, o qual utiliza gás carbônico. Em seguida a amostra foi fixada no *Stub* com uma fita de carbono e levada até o equipamento da marca Leica EM SCD050 para realizar a etapa de metalização, que forma uma camada de ouro na superfície da amostra, a qual permitirá a visualização no Microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo (FESEM).

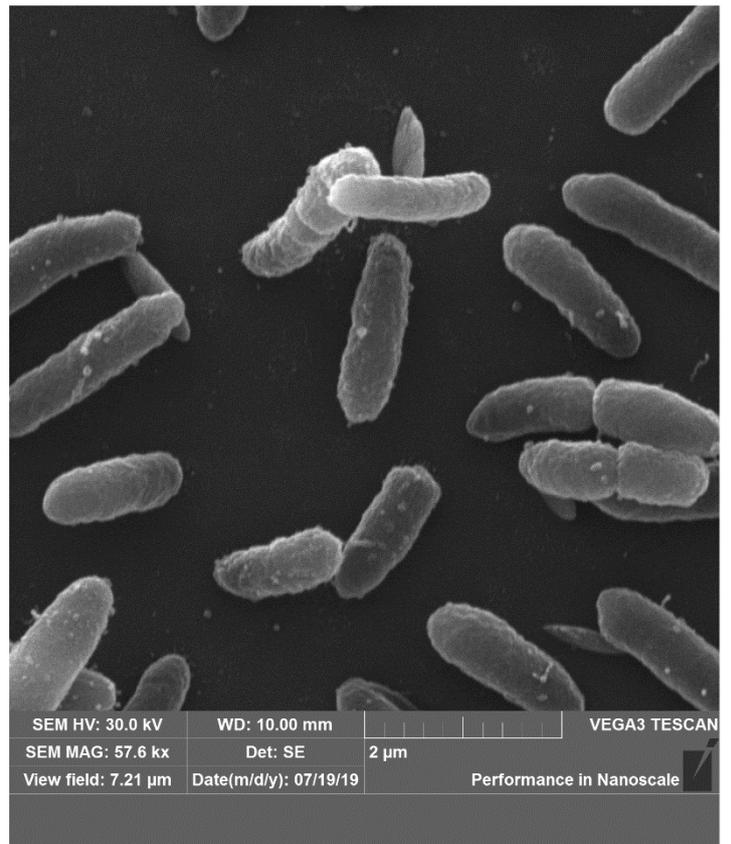
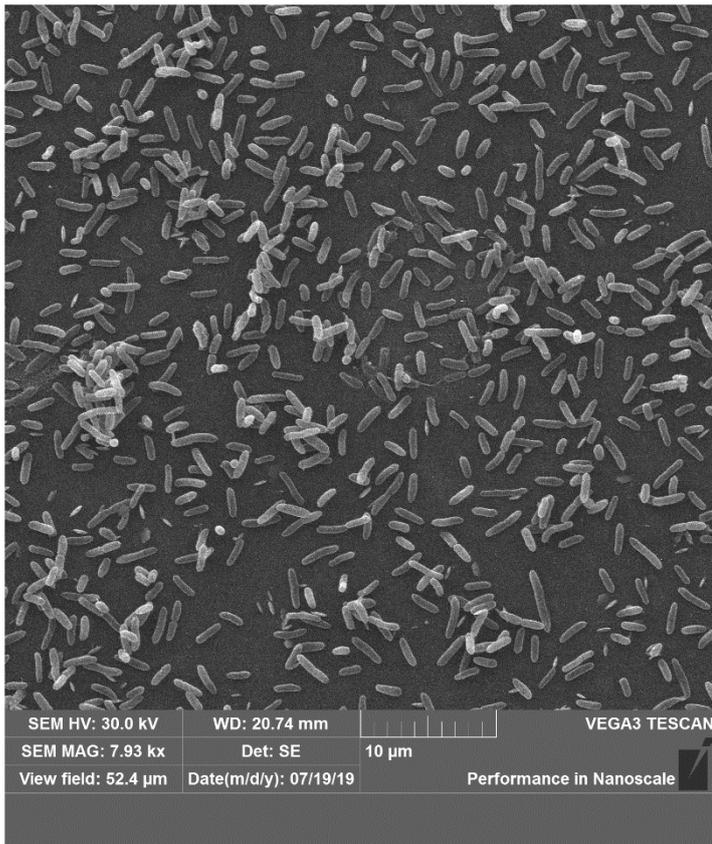


Figura II - Apêndice: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da cultura mista 38-XC4, contendo as bactérias *Aeromonas salmonicida* AE38-XC4 e *Acinetobacter pittii* ACP38-XC4.

Anexos

ANEXOS

1. Produtividade no período do doutorado

1.1 Artigos publicados como primeira autora

- Silva SD, Guedes FAF, Amaral JRV, Ribeiro JRA, Souza YPA, Freitas-Almeida ÂC, Thompson FL, Ramos RTJ, Whiteley AS, Macrae A, Oliveira SS. *Aeromonas allosaccharophila* Strain AE59-TE2 Is Highly Antagonistic towards Multidrug-Resistant Human Pathogens, What Does Its Genome Tell Us? *Life* (Basel). 2022 Sep 26;12(10):1492. doi: 10.3390/life12101492. PMID: 36294926; PMCID: PMC9605075.
- Silva SD*, Peckle BA*, Ribeiro JRA, Oliveira SS, Bianco K, Clementino MM, Direito ICN, Macrae A. The Genome Sequence of *Brucella intermedia* DF13, a 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid-Degrading Soil Bacterium Isolated in Brazil. *Microbiol Resour Announc*. 2022 Apr 21;11(4):e0110521. doi: 10.1128/mra.01105-21. Epub 2022 Mar 28. PMID: 35343769; PMCID: PMC9022513.
- Peckle BA*, Silva SD*, Ribeiro JRA, Oliveira SS, Vianez-Júnior JLSG, Direito ICN, Macrae A. The Genome of *Enterobacter hormaechei* Strain MG02, a 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid-Degrading Bacterium Isolated from Brazilian Soil. *Microbiol Resour Announc*. 2022 Mar 17;11(3):e0110421. doi: 10.1128/mra.01104-21. Epub 2022 Feb 28. PMID: 35225675; PMCID: PMC8928775. *Contributed equally. Barbara Alvarenga Peckle and Sheila da Silva contributed equally to this article. Author order was determined both alphabetically and in order of increasing seniority.

1.2 Artigo publicado como segunda autora

- Silveira SMD, Silva SD, Macrae A, Ramos RTJ, Araújo FA, Schultz J, Góes-Neto A, Costa MMD, Soares SC, Azevedo VAC, Aburjaile FF, Brenig B, Rosado AS, Oliveira SS. Genome Sequence of *Pseudomonas* sp. Strain LAP_36, A Rhizosphere Bacterium Isolated from King George Island, Antarctica. *Microbiol Resour Announc*. 2021 Dec 2;10(48):e0073121. doi: 10.1128/MRA.00731-21. Epub 2021 Dec 2. PMID: 34854719; PMCID: PMC8638591.

1.3 Artigos em produção relacionados a tese

- Silva, SD; Guedes, FAF; Vidal Amaral, JR; Ribeiro, VAS; Peckle, BA; Araújo, FA; Thompson, F; Jucá Ramos, RT; Whiteley, AS.; Macrae, A; Oliveira, SS. The Metagenome Assembled Genome (MAG) of Mixed culture containing *Aeromonas salmonicida* strain AE38.XC4 and *Acinetobacter pittii* ACP38.XC4 from fish used to control important animal and human pathogenic microorganisms.
- Silva, SD; Vidal Amaral, JR, Silva, VAS; Peckle, BA; Ribeiro, VAS; Whiteley, AS; Macrae, A; Oliveira, SS. Discovering Bacteriocin Diversity in Water and *Serrasalmus rhombeus* Fish Samples From São Benedito River-PA, Brazil Through Metagenomic Analysis

2. Atividades extras na pós-graduação

- Organização do evento internacional “**Encontro de Biotecnologia/PBV**” nos anos 2019, 2020, 2021 e 2022;
- Projetos de extensão
ECOCHÉF: Oficina de pães: “é pra ver ou pra comer?” – 2019 (UFRJ)
Hoje Nossa Escola É a Universidade – 2019 (UFRJ)
Hoje Nossa Escola É a Universidade – 2018 (UFRJ)
- Comissão avaliadora interna do programa para indicação de alunos à melhor tese da CAPES - 2019.
- Comissão avaliadora do processo de seleção de bolsas de doutoramento sanduíche e de pesquisador sênior do CAPES-PRINT nos anos de 2019, 2020, 2021, 2022 e 2023.
- Discente representante do programa nos anos de 2019, 2020, 2021 e 2022/abril.

3. Orientação de alunos durante a pós-graduação

3.1 Iniciação Científica

1. Bianca Melo Oliveira de Jesus. DETECÇÃO DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE LEVEDURAS COM GRANDE APLICABILIDADE INDUSTRIAL. Início: 2022. Iniciação científica (Graduando em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. (Orientador).

2. Mayra Faria Basilio Dos Santos. CONTROLE DE BACTÉRIAS DETERIORANTES DE ALIMENTOS ATRAVÉS DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS PRODUZIDAS POR LEVEDURAS. Início: 2022. Iniciação científica (Graduando em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. (Orientador).

3. Jessyca Gomes Olimpio. INVESTIGAÇÃO DE LEVEDURAS PRODUTORAS DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS CAPAZES DE COMBATER BACTÉRIAS PATOGÊNICAS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA. Início: 2022. Iniciação científica (Graduando em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. (Orientador).

4. Vicente Almeida Serafim da Silva. Análise Metagenômica (Metagenome-Assembled Genome - MAG) de estirpes bacterianas oriundas de peixes com alto potencial antimicrobiano. Início: 2022. Iniciação científica (Graduando em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. (Orientador).

5. Luan dos Santos Maciel Almeida. Bioprospecção de Substâncias antimicrobianas. Início: 2022. Iniciação científica (Graduando em Ciências Biológicas: Biotecnologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. (Orientador).

6. Alex Pessoa da Silva. Bioprospecção de Substâncias antimicrobianas. Início: 2022. Iniciação científica (Graduando em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. (Orientador).

3.1 Trabalho de conclusão de curso

1. Gabryel Bernardo Vieira de Lima. CARACTERIZAÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE *Escherichia coli* OBTIDAS DE SUÍNOS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PRODUTOS ALTERNATIVOS. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Vale do São Francisco. Orientador: Sheila da Silva.

2. Jônathas Moreno Silva de Souza, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FENOTÍPICA DE FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE *Escherichia coli* OBTIDAS DE BOVINOS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PRODUTOS NATURAIS E POLIMERO. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Vale do São Francisco. Orientador: Sheila da Silva.

3. Felipe da Silva Diniz. Detecção e bioprospecção de substâncias antimicrobianas em bactérias isoladas do peixe da espécie *Serrasalmus rhombeus* (nome popular “Piranha-preta”). 2022. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas: Modalidade Médica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Sheila da Silva.

4. SARAH MEDEROS DA SILVEIRA. BIOPROSPECÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS EM ISOLADOS PSICROTOLERANTES E TERMOTOLERANTES DA REGIÃO ANTÁRTICA. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. Orientador: Sheila da Silva.

5. João Ricardo Amaral. Análise Genômica com uso de bioinformática na busca por clusters de genes de peptídeos antimicrobianos em estirpes de *Aeromonas* sp. e *Acinetobacter* sp. ambientais. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas - Genética) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. Orientador: Sheila da Silva.

4. Link do Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/6142200312451720>