



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA - REDE
BIONORTE**



**ANÁLISE GENÔMICA DE *Limosilactobacillus fermentum* ATCC 23271,
UMA LINHAGEM COM POTENCIAL PROBIÓTICO E ATIVIDADE
ANTI-*Candida***

CAMILLA ITAPARY DOS SANTOS

**SÃO LUÍS – MA
2021**

CAMILLA ITAPARY DOS SANTOS

**ANÁLISE GENÔMICA DE *Limosilactobacillus fermentum* ATCC 23271,
UMA LINHAGEM COM POTENCIAL PROBIÓTICO E ATIVIDADE
ANTI-*Candida***

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientador(a): Prof. Dr. Valério Monteiro Neto

**SÃO LUÍS – MA
2021**

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Santos, Camilla Itapary.

ANÁLISE GENÔMICA DE *Limosilactobacillus fermentum* ATCC 23271, UMA LINHAGEM COM POTENCIAL PROBIÓTICO E ATIVIDADE ANTI-Candida / Camilla Itapary Santos. - 2021.

74 f.

Orientador(a): Valério Monteiro Neto.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Rede - Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2021.

1. Análise genômica. 2. *Limosilactobacillus fermentum* ATCC 23271. 3. Probiótico. I. Monteiro Neto, Valério.
II. Título.

CAMILLA ITAPARY DOS SANTOS

**ANÁLISE GENÔMICA DE *Limosilactobacillus fermentum* ATCC 23271,
UMA LINHAGEM COM POTENCIAL PROBIÓTICO E ATIVIDADE
ANTI-*Candida***

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Aprovada em 21/12/2021

Banca examinadora

Prof. Dra. Rita de Cássia Mendonça de Miranda
Universidade CEUMA

Prof. Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Luís Cláudio Nascimento da Silva
Universidade CEUMA

Prof. Dra. Cristina de Andrade Monteiro
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão

Prof. Dr. Afonso Gomes Abreu Júnior
Universidade CEUMA

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por ter permitido que eu chegasse até aqui e por ter me dado a honra de ter diversas pessoas especiais ao longo dessa jornada;

À minha família por todo o amor, inspiração, suporte, compreensão e estrutura para que eu pudesse me dedicar ao doutorado, pois sem eles eu nada seria;

Às instituições CEUMA e FAPEMA que permitiram que eu tivesse estrutura e financiamento necessários para desenvolvimento da pesquisa;

Aos professores que me acolheram durante essa jornada, em especial ao meu orientador e pai na pesquisa, Prof. Dr. Valério Monteiro; à Prof. Dra. Cristina Monteiro que me iniciou nessa vida da pesquisa e, portanto, é minha mãe na pesquisa; à Prof. Dra. Andrea Monteiro por me ajudar sempre e se mostrar sempre disponível; à Prof. Dra. Maria Rosa Quaresma Bomfim que também sempre se fez presente no laboratório e esteve ao meu lado durante boa parte da pesquisa;

Ao Seu Hélio que tanto me ajudou na rotina laboral e sem o qual eu também não conseguiria fazer os experimentos em tempo hábil;

Aos meus amigos e companheiros de laboratório: Carmem, Viviane, Larissa, Flávio, Ennio, Laoane, Hermerson, por tornarem os dias mais leves, sempre ajudarem nos experimentos e não me deixarem desistir durante os momentos de dificuldades;

Aos alunos da Prof. Andrea: Wallace e Rômulo que também fizeram parte desse trabalho.

Às amigas Fernanda, Márcia, Ísis, Amélia, e ao meu namorado João Vitor que sempre me apoiaram, entenderam meus sumiços e estenderam um ombro amigo sempre que eu precisei.

RESUMO

SANTOS, Camilla Itapary dos. **Análise genômica de *Limosilactobacillus fermentum* ATCC 23271, uma linhagem com potencial probiótico e atividade anti-*Candida***. 2021. 74 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2021.

Vários microrganismos vêm sendo estudados como potenciais probióticos nos últimos anos. Alguns desses estudos mostram benefícios à saúde, inclusive em ensaios clínicos com humanos. Esses benefícios podem estar relacionados à sua habilidade de regular a microbiota intestinal através da competição por sítios de adesão, bem como pela produção de compostos antimicrobianos e/ por apresentarem efeitos imunomodulatórios. O presente estudo teve como objetivo realizar uma análise genômica de *Limosilactobacillus fermentum* ATCC 23271 em relação ao seu uso como microrganismo probiótico. Para isso, foi realizado o sequenciamento genômico da linhagem, seguido de análise filogenética em comparação com os genomas de outras linhagens de *L. fermentum*, bem como análises em diferentes bases de dados visando detectar potenciais genes relacionados a tolerância aos sais biliares, enzimas digestivas e pH ácido, genes associados às propriedades de adesão, genes de bacteriocinas e genes relacionados à segurança da linhagem para uso humano. Também foram feitos testes *in vitro* para confirmar a atividade antimicrobiana e interferência na adesão de patógenos. A análise do genoma revelou que a linhagem ATCC 23271 possui 2.193.335 bp, com 2.123 sequências codificadoras de proteínas e um conteúdo de guanina-citosina de 50,9%. A análise filogenética revelou que a cepa ATCC 23271 compartilha 941 clusters de genes com seis outras cepas probióticas de *L. fermentum*, mas apenas 13 clusters são exclusivos da ATCC 23271. Foram identificados no seu genoma genes conhecidos por conferir propriedades probióticas, incluindo genes relacionados a adesão, tolerância a pH ácido e sais biliares, tolerância ao estresse oxidativo, metabolismo e transporte de açúcares e outros compostos. O programa BAGEL 4 mostrou a presença de uma proteína hipotética com baixa similaridade (48%) com a enterolisina A. A linhagem demonstrou ser segura para uso humano, visto que seu genoma não revelou genes de resistência adquirida a antibióticos e nem genes relacionados à virulência, não sendo caracterizada como patógeno humano. Além disso, *loci* gênicos associados com sequências CRISPR/CRISPR e duas regiões de profago incompletas foram detectadas no genoma, o que limitaria a disseminação de eventuais genes de resistência adquirida. A tolerância aos sais biliares (0,5 e 1.0%) e ao pH ácido (pH 2. e 4.0) foi demonstrada *in vitro*. Foi observada a capacidade de inibir a adesão de algumas linhagens de *Candida* às células HeLa, principalmente dos isolados clínicos genitais, nos ensaios de

competição e deslocamento. No ensaio de antagonismo foi confirmado que a linhagem tem a capacidade antifúngica, uma vez que inibiu diferentes linhagens de *Candida* spp., exceto duas de *C. krusei*, porém não apresentou nenhuma inibição relevante contra as linhagens bacterianas utilizadas. Além disso, todos os antibióticos aos quais *L. fermentum* ATCC 23271 mostrou resistência ou foi moderadamente suscetível eram sugestivos de resistência intrínseca, mas não de adquirida. Nossos dados revelam as características do genoma de *L. fermentum* ATCC 23271 que podem demonstrar um quadro promissor para o uso dessa bactéria probiótica por seus benefícios funcionais, principalmente contra infecções por *Candida*.

Palavras-chave: *Limosilactobacillus fermentum* ATCC 23271; probiótico; análise genômica.

ABSTRACT

SANTOS, Camilla Itapary dos. **Genomic analysis of *Limosilactobacillus fermentum* ATCC 23271, a potential probiotic strain and anti-*Candida* activity.** 2021. 74 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2021.

Several microorganisms have been studied as potential probiotics in recent years. Some of these studies show health benefits, including in human clinical trials. These benefits may be related to its ability to regulate the intestinal microbiota through competition for adhesion sites, as well as the production of antimicrobial compounds and/or by presenting immunomodulatory effects. This study aimed to perform a genomic analysis of *Limosilactobacillus fermentum* ATCC 23271 in relation to its use as a probiotic microorganism. For this, the genomic sequencing of the strain was performed, followed by phylogenetic analysis in comparison with the genomes of other strains of *L. fermentum*, as well as analysis in different databases to detect potential genes that code for proteins related to tolerance to bile salts, digestive enzymes and acid pH, genes associated with the adhesion properties, bacteriocin production and genes related to the strain safety for human use. *In vitro* tests were also performed to confirm antimicrobial activity and interference with pathogen adhesion. Genome analysis revealed that the ATCC 23271 strain has 2,193,335 bp, with 2,123 protein coding sequences and a guanine-cytosine content of 50.9%. Phylogenetic analysis revealed that the ATCC 23271 strain shares 941 gene clusters with six other probiotic strains of *L. fermentum*, but only 13 clusters are unique to ATCC 23271. Genes known to confer probiotic properties have been identified in its genome, including genes related to adhesion, tolerance to acid pH and bile salts, tolerance to oxidative stress, metabolism and transport of sugars and other compounds. The BAGEL 4 program showed the presence of a hypothetical protein with low similarity with enterolysin A. The strain proved to be safe for human use, because its genome did not reveal genes of acquired resistance to antibiotics or genes related to virulence, not being characterized as a human pathogen. Furthermore, gene loci associated with CRISPR/CRISPR sequences and two incomplete regions of prophage were detected in the genome, which would limit the spread of possible acquired resistance genes. Tolerance to bile salts (0.5 and 1.0%) and acid pH (pH 2. and 4.0) has been demonstrated *in vitro*. The ability to inhibit the adhesion of some *Candida* strains to HeLa cells, especially the genital clinical isolates, was observed in competition and displacement assays. In the antagonism assay, it was confirmed that the strain has antifungal capacity, since it inhibited different strains of *Candida* spp., except two of *C. krusei*, without relevant inhibition of the tested

bacteria. Furthermore, all antibiotics to which *L. fermentum* ATCC 23271 showed resistance or was moderately susceptible were suggestive of intrinsic, but not of acquired resistance. Our data revealed that *L. fermentum* ATCC 23271 has genomic features that demonstrate it is a promising strain for use as a probiotic due to its functional benefits, especially against *Candida* infections.

Keywords: *Limosilactobacillus fermentum* ATCC 23271; probiotic; genomic analysis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
1.1 OBJETIVO GERAL	9
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 INFECÇÕES CAUSADAS POR <i>CANDIDA</i>	10
2.2 UTILIZAÇÃO DE PROBIÓTICOS NO TRATAMENTO DE CANDIDÍASE ...	13
2.3 COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS PRODUZIDOS POR <i>LIMOSILACTOBACILLUS</i>	15
2.4 PROPRIEDADES PROBIÓTICAS DE <i>L. FERMENTUM</i>	18
2.5 ANÁLISE GENÔMICA COMO FERRAMENTA DE CARACTERIZAÇÃO DE PROBIÓTICOS.....	22
3 CAPÍTULO I	25
4 CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

Candidíase é uma doença causada por uma levedura comensal do gênero *Candida*, que em condições adversas, especialmente em indivíduos imunocomprometidos, pode levar a infecções orais, vulvovaginais e sistêmicas (RIBEIRO et al., 2019). Nas últimas décadas tem-se observado um aumento de infecções fúngicas profundas, não só em pacientes imunocomprometidos, como em infecções nosocomiais e na população saudável. Também tem aumentado a incidência de infecções causadas por *Candida não-albicans* (FRIEDMAN; SCHWARTZ, 2019). Atualmente infecções sistêmicas causadas por *Candida* são a quarta maior causa de infecções nosocomiais da corrente sanguínea e correspondem a 90% de todas as infecções invasivas (PRISTOV; GHANNOUM, 2019). Adicionalmente, tem sido observado um aumento da resistência aos antimicrobianos utilizados atualmente: azóis e equinocandinas, por isso é importante a busca por novas abordagens terapêuticas (PRISTOV; GHANNOUM, 2019). Uma alternativa de tratamento ou adjuvante de tratamento muito estudada atualmente consiste no uso de probióticos.

Probiótico é um termo contemporâneo que significa “para a vida” e é utilizado para denominar associações bacterianas com efeitos benéficos à saúde humana e animal, quando administrados de forma adequada (HILL et al., 2014). Uma das primeiras observações referentes ao uso de probióticos no tratamento de distúrbios intestinais foi feita pelo médico pediatra Henry Tissier, que observou que as bifidobactérias são os microrganismos predominantes na microbiota intestinal de crianças alimentadas com leite materno. A partir dessa observação, ele sugeriu que as gastroenterites agudas poderiam ser tratadas se o equilíbrio intestinal fosse restaurado com o uso de bifidobactérias (OZEN; DINLEYICI, 2015).

Assim, vários microrganismos vêm sendo estudados, durante os últimos anos, com o objetivo de caracterização do potencial probiótico. Entre eles destacam-se linhagens pertencentes aos seguintes gêneros: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Propionibacterium*, *Saccharomyces* e, especialmente, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (CHUGH; KAMAL-ELDIN, 2020). Alguns desses estudos mostraram os benefícios à saúde, inclusive em ensaios clínicos com humanos. Entre os benefícios já estudados podemos citar: a redução da diarreia associada a antibióticos e por rotavírus (LAI et al., 2019; KIM et al., 2018); a redução da recorrência de câncer superficial de bexiga (NADA et al., 2020); modulação imunológica (ENGEVIK et al., 2021); vacinação oral melhorada (PERONI; MORELLI, 2021); a redução da colonização por *Helicobacter pylori* (FANG et al., 2019);

alívio da síndrome do intestino irritável (HAN et al., 2019); redução do colesterol LDL (WANG et al, 2019a; COSTABILE et al., 2017); alívio da doença inflamatória intestinal (LE; YANG, 2018) e o tratamento e prevenção de alergias (KIM et al., 2019; CUKROWSKA et al., 2021).

Para uso no homem, um probiótico deve ser, preferencialmente, de origem humana, seguro e livre de vetores genéticos capazes de transferir genes de resistência a antibióticos e/ou de virulência; além de ter ótima capacidade de sobreviver em condições intestinais (pH ácido, enzimas, sais biliares, etc.) (KERRY *et al.*, 2018). Adicionalmente, um probiótico deve exibir antagonismo contra patógenos, estimular o sistema imunológico e outros efeitos benéficos comprovados. A escolha do microrganismo a ser usado como probiótico é determinado por muitas características diferentes, algumas delas incluem: a resistência a enzimas pancreáticas, ácido e sais biliares; capacidade de adesão à mucosa intestinal; ter efeitos documentados à saúde; ser seguro e ter boas propriedades tecnológicas (SEALE; MILLAR, 2013). Para uso de probióticos na tecnologia de fabricação de alimentos, é necessário que o microrganismo possua boas propriedades tecnológicas incluindo: boa capacidade de multiplicação, promover propriedades organolépticas (olfato e paladar) adequadas ao produto, além de permanecerem estáveis e viáveis durante o armazenamento (OLIVEIRA et al., 2002).

Os benefícios produzidos por probióticos podem estar relacionados à sua habilidade de regular a microbiota intestinal através da competição por sítios de adesão, bem como pela produção de compostos antibacterianos, que também podem apresentar efeitos imunomodulatórios (DORON et al., 2008). Mecanismos que ajudam na modulação do sistema imune, podem fazer com que a resposta dos anticorpos seja maior e a inflamação menor, além de estimular a fagocitose, dentre vários outros mecanismos (SANDERS *et al.*, 2019). Vale ressaltar que os efeitos probióticos tendem a ser específicos para determinada linhagem, então um benefício para a saúde atribuído a uma linhagem não é necessariamente aplicável a outra, mesmo dentro da mesma espécie. Portanto, generalizações sobre potenciais benefícios à saúde não devem ser feitos (WILLIAMS, 2010).

Conforme demonstrado anteriormente em estudo desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, Carmo et al. (2016) analisou a linhagem *L. fermentum* ATCC 23271, obtido inicialmente de intestino humano, contra diversos microrganismos e observou que poderia ser um potencial probiótico associado ao tratamento de candidíase devido à sua propriedade de co-agregação e deslocamento do patógeno no processo de adesão à mucina.

Recentemente a espécie *Lactobacillus fermentum*, entre outras, sofreu uma mudança em sua taxonomia, passando a se chamar *Limosilactobacillus*. Tendo em vista que

Lactobacillus fermentum (atualmente *Limosilactobacillus fermentum*) é uma das espécies com efeitos benéficos importantes já relatados (ZHAO et al., 2019; SINGH et al., 2013), e que não existem estudos mais detalhados de sequenciamento gênico que confirmem as propriedades probióticas já relatadas, o presente trabalho buscou analisar o genoma de *L. fermentum* ATCC 23271 em busca de características que o identificassem como um bom candidato a probiótico, com propriedades anti-*Candida*.

1.1 OBJETIVO GERAL

Realizar uma análise genômica de *Limosilactobacillus fermentum* ATCC 23271 em relação ao seu uso como microrganismo probiótico e a sua atividade anti-*Candida*.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Analisar o genoma de *L. fermentum* ATCC 23271 em diferentes bases de dados visando detectar potenciais genes que codifiquem para proteínas associadas ao seu potencial probiótico, incluindo genes relacionados a tolerância aos sais biliares, enzimas digestivas e pH ácido, genes associados às propriedades de adesão, síntese de bacteriocinas e relacionadas a segurança para uso humano;

b) Realizar uma análise filogenética comparando o genoma da linhagem em estudo com os de outras seis da mesma espécie para evidenciar possíveis similaridades de mecanismos de ação probiótica

c) Investigar a capacidade *L. fermentum* ATCC 23271 em inibir a adesão de *Candida* às células eucarióticas;

d) Verificar a atividade inibitória da linhagem sobre o crescimento de bactérias e espécies de *Candida*;

e) Determinar o perfil de susceptibilidade a antibióticos para verificar se perfil é sugestivo de resistência intrínseca ou adquirida.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 INFECÇÕES CAUSADAS POR *CANDIDA*

Leveduras do gênero *Candida* são microrganismos comensais encontrados em diversos sítios anatômicos, incluindo: pele, cavidade oral, gastrointestinal, urogenital e trato respiratório de indivíduos saudáveis (SARDI et al., 2013; MUNDULA et al., 2019). Sob certas condições, a proliferação exacerbada dessas leveduras pode causar desde infecções superficiais a sistêmicas (SARDI et al., 2013; RIBEIRO et al., 2020). Nas últimas décadas a incidência de infecções fúngicas têm aumentado devido às doenças crônicas imunossupressoras (diabetes, câncer, SIDA) e do amplo uso de drogas como antibióticos, quimioterápicos para o tratamento de câncer e imunossupressores (LASS-FLÖRL, 2009; MUNDULA et al., 2019).

As formas de infecção mais frequentemente encontradas são a candidíase vulvovaginal, oral e invasiva, acometendo cerca de 130 milhões, 15 milhões e 700 mil pessoas, respectivamente (WILLEMS et al., 2020). A candidíase vulvovaginal é a forma mais prevalente e pode atingir até 75% das mulheres pelo menos uma vez na vida, apresentando como principais sintomas coceira, vermelhidão da região, dor, além de corrimento com aparência de “leite talhado” (WILLEMS et al., 2020). Além disso a candidíase vulvovaginal recorrente afeta cerca de 8% das mulheres e corresponde a mais de 3 episódios por ano (DENNING et al., 2018). Ao contrário das formas oral e invasiva, a candidíase vaginal afeta indivíduos imunocompetentes e saudáveis (FIDEL JUNIOR, 2002). Normalmente, o agente causador é da espécie *C. albicans*, atingindo cerca de 90% dos casos e, entre as *Candida* não-*albicans*, *C. glabrata* tem a maior taxa de incidência (WILLEMS et al., 2020). Os fatores de risco para candidíase vulvovaginal incluem o uso de antibióticos, anticoncepcional oral, gravidez, diabetes, entre outros (GONÇALVES et al., 2016).

A candidíase oral é a infecção oral oportunista mais comum em indivíduos acometidos pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e em indivíduos que apresentam sistema imunológico enfraquecido por outros fatores, como a idade (VILA et al., 2020). Fatores como diabetes, câncer, uso de próteses dentárias, depressão, também influenciam no aparecimento da infecção (REINHARDT et al., 2018). Normalmente, apresenta-se de forma assintomática, porém entre os sintomas mais citados estão: ardência, queimação, dor, presença de placas brancas na língua (SHARMA, 2019). A candidíase oral pode ser classificada em: candidíase aguda, candidíase crônica e lesões associadas a *Candida* na cavidade oral (SHARMA, 2019).

Candidíase invasiva é o termo utilizado para falar das infecções que atingem a corrente sanguínea, também conhecida como candidemia, e das infecções profundas que causam abscesso intra-abdominal, peritonite ou osteomielite (PAPPAS et al., 2018). Trata-se de uma infecção emergente e amplamente reconhecida como a maior causa de morbidade e mortalidade em instituições de saúde (MAGILL et al., 2014; CLEVELAND et al., 2015; KULLBERG; ARENDRUP, 2015; MCCARTY; PAPPAS, 2016). Para que ocorra esse tipo de infecção, é preciso que haja uma proliferação do patógeno em conjunto com uma deficiência do sistema imune do hospedeiro (PAPPAS et al., 2018). Assim como nas outras formas, *C. albicans* é o principal agente causador de candidíase invasiva. No entanto, *Candida não-albicans* pode representar mais de 50% dos isolados em certas regiões (FATHI et al., 2016).

Atualmente um número limitado de drogas terapêuticas são utilizadas no tratamento de candidíase, as quais são classificadas em: azóis, equinocandinas, polienos, análogos de nucleosídeos, alilaminas, tiocarbamatos e griseofulvina (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013). Cada uma dessas drogas possui um mecanismo de ação diferente para inibir o crescimento das leveduras. O azóis correspondem à maior classe de drogas antifúngicas e atuam destruindo a membrana celular através da inibição da atividade de lanosterol 14- α -desmetilase, enzima envolvida no processo de síntese de ergosterol, componente da membrana celular fúngica (HOF, 2006). As equinocandinas são antifúngicos lipopeptídicos que inibem a síntese de (1,3)- β -D-glucana, um polissacarídeo específico da parede celular de fungos, causando instabilidade da integridade da parede, podendo levar a lise osmótica (GROVER, 2010). Os polienos se ligam ao ergosterol e resultam na produção de poros aquosos, alterando a permeabilidade celular e conseqüentemente, à morte da célula (SANGLARD; ODDS, 2002). A flucitosina é um análogo de pirimidina e é transportado para dentro da célula pela enzima citosina permease, onde irá interferir na síntese de DNA, RNA e de proteínas (VERMES; GUCHELAAR; DANKERT, 2000; ONISHI et al., 2000). Alaminas e tiocarbamatos atuam inibindo a síntese de esqualeno epoxidase, enzima envolvida no processo de síntese de ergosterol e, portanto, são responsáveis pela destruição da membrana celular (SANGLARD, COSTE, FERRARI, 2009). A griseofulvina é responsável pela destruição do fuso e da produção de microtúbulos, interferindo, portanto, no processo de mitose (FRANÇOIS et al., 2005). Entretanto, algumas dessas drogas apresentam efeitos colaterais como toxicidade hepática e renal; desconforto gastrointestinal, incluindo náusea, vômito e diarreia (RIBEIRO et al. 2020; LASS-FLÖRL, 2009).

Além do problema da toxicidade, existe também o aumento de resistência antimicrobiana aos fármacos tradicionais. Existem dois tipos de resistência: clínica e

micológica. A resistência clínica ocorre quando um antifúngico com atividade *in vitro* é incapaz de erradicar a infecção fúngica, enquanto a resistência micológica ocorre quando o fungo é capaz de crescer na presença do antifúngico que deveria matá-lo durante os testes *in vitro* (PRISTOV; GHANNOUM, 2019). Um dos principais fatores responsáveis pela resistência a antifúngicos é a capacidade de formação de biofilme. O biofilme é um conjunto de células de microrganismos, podendo inclusive apresentar mais de uma espécie, envoltos por uma matriz extracelular, tornando mais difícil a penetração de drogas (HARRIOTT et al., 2010). Biofilmes são geneticamente resistentes a anfotericina B e fluconazol, tanto clinicamente como micologicamente (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017; GAO et al., 2018). Existem três mecanismos através dos quais *Candida* pode se tornar resistente aos azóis. O primeiro deles é a partir de bombas de efluxo que possibilitam que a levedura expulse a droga (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013; NAMI et al., 2019). O segundo mecanismo consiste na regulação da expressão gênica de *ERG11*, que codifica a enzima alvo dos azóis, dessa forma, previne a ligação da droga (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013; NAMI et al., 2019). O terceiro mecanismo é um resultado de mutações que permite a formação de outro caminho que não é interrompido pela ação dos azóis e que previne a alteração da membrana celular e a acumulação de produtos tóxicos (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013). A resistência a polienos é extremamente rara, porém pode ocorrer através da alteração de enzimas que reduzem afinidade de ligação com drogas ou deletam ergosterol da membrana (ELLIS, 2002). Para a maioria das leveduras do gênero *Candida*, a resistência a equinocardinas está relacionada com mutações nos genes *FKS* que codificam a subunidade catalítica da enzima alvo da droga, a (1,3)- β -D-glucana sintase (LEE et al., 2020).

Atualmente ainda existe a preocupação com a espécie emergente *C. auris*, que vem se espalhando em infecções nosocomiais por todo o mundo e, apesar de apresentar menor virulência se comparada a *C. albicans*, possui altas taxas de mortalidade, principalmente em pacientes imunocomprometidos (CHAABANE et al., 2019). Um dos fatores relacionados à sua taxa de sucesso nas infecções é sua capacidade de formar biofilmes e sua baixa taxa de susceptibilidade aos antifúngicos utilizados atualmente (BORMAN; SZEKELY; JOHNSON, 2016; SHERRY et al., 2017).

Por esse motivo é importante a busca e desenvolvimento de novos profiláticos e estratégias complementares. O uso de probióticos é uma dessas alternativas e diversos trabalhos já vêm comprovando que esses microrganismos são capazes de inibir o crescimento e a formação de biofilme de *Candida in vitro* (ANDRADE et al., 2021).

2.2 UTILIZAÇÃO DE PROBIÓTICOS NO TRATAMENTO DE CANDIDÍASE

Os mecanismos de ação dos probióticos podem incluir: inibição dos sítios de adesão; inibição da adesão por co-agregação; secreção de moléculas antimicrobianas; modulação do sistema imune do hospedeiro; manutenção da saúde intestinal através do reequilíbrio da disbiose intestinal, entre outros (RIBEIRO et al. 2020; GAGLIARDI et al. 2018; SILVERBERG; SILVERBERG 2014; AZAD, et al. 2018; BERNINI et al. 2018; COSSEAU et al. 2008). Um dos principais mecanismos de ação dos probióticos na redução de virulência de *Candida*, está relacionado com a diminuição de formação de biofilme (SHENOY; GOTTLIEB, 2019). Rossoni et al. (2018) testaram 30 *Limosilactobacillus* isolados da cavidade oral de hospedeiros sem cáries contra *C. albicans* (uma linhagem de referência e duas clínicas) e observaram que 3 isolados obtiveram melhores resultados na diminuição da formação de biofilme e no retardamento da formação de hifas (importante fator de virulência de *Candida*). Também foi observado uma diminuição da expressão de genes específicos por regular a formação de biofilme de *C. albicans* (*ALS3*, *HWPI*, *EFG1* e *CPHI*) (ROSSONI et al., 2018). Matsubara et al. (2016) também demonstraram que o sobrenadante de *L. rhamnosus* LR32 foi capaz de inibir o desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* nos estágios iniciais, porém não produziu efeito no biofilme maduro. James et al. (2016) observaram que o uso de probióticos individuais ou em combinação com diferentes espécies, seja na forma de sobrenadantes ou microrganismos vivos é capaz de diminuir a formação de biofilme de *C. albicans* através da regulação de genes envolvidos na transição de levedura para hifa, formação de biofilme, invasão tecidual e dano celular. *C. auris* é um patógeno emergente que possui considerável resistência aos antifúngicos e tanto as células vivas como pós-bióticos (extrato cru e fração) de *L. paracasei* 28.4 apresentaram atividade antifúngica contra células planctônicas, biofilmes, e células persistentes de *C. auris*, além de proteger *Galleria mellonella* infectada com *C. auris*, aumentando sua resposta celular e humoral (ROSSONI et al., 2020).

Limosilactobacillus podem inibir o crescimento de *Candida* através da competição por nutrientes e pela produção de ácidos orgânicos, incluindo ácido lático, que reduz o pH e cria um ambiente desfavorável, levando ao aumento da expressão de genes relacionados ao estresse (*SIS1*, *TPS3*, *HSP78*, *TPO3*, *SEO1*) (KOHLENER; ASSEFA; REID, 2012). O co-cultivo na presença de *Limosilactobacillus* também levou à repressão de genes relacionados à síntese de ergosterol (*ERG6*, *ERG11*, orf19.2016) e genes envolvidos na formação de bombas de efluxo (*CDR1*), que estão relacionados à resistência a antifúngicos (KOHLENER; ASSEFA; REID, 2012). Esses achados podem contribuir para uma terapêutica adicional ao uso de

antifúngicos, melhorando assim, sua eficiência. Leão et al. (2018) observaram que a administração de *L. rhamnosus* em camundongos em modelo de candidíase oral resultou em uma diminuição significativa de *Candida*, além de diminuição de infiltrados inflamatórios e tecidulares.

Um importante fator de virulência responsável pela infecção causada por *Candida* é sua capacidade de mudar a morfologia das células de leveduras para hifas, e assim, invadir tecidos. Allonsius et al. (2019) descobriram que a linhagem *L. rhamnosus* GG possui uma proteína de superfície Msp1 que é responsável por quebrar quitina, principal polímero da parede celular de hifas, utilizando-a como substrato e reduzindo em 50% a formação de hifas. Também foi possível observar que Msp1 atua em sinergismo com ácido lático, aumentando a taxa de redução de hifas para 94% (ALLONSIUS et al., 2019).

Probióticos podem ser administrados de diversas formas, incluindo: enxaguantes bucais, cremes vaginais, pasta de dentes, cápsulas ou através de alimentos (ANDRADE et al., 2021). Amižić et al. (2017) avaliaram a atividade antimicrobiana de dois probióticos (*L. paracasei* e *L. acidophilus*) manipulados em forma de pasta de dentes em relação a pasta de dente sem probiótico em combinação com dois enxaguantes bucais (contendo combinação de óleos essenciais e outro com hexetidina). Os resultados mostraram que as pastas de dentes contendo probióticos apresentaram maiores efeitos inibitórios contra *C. albicans* e *Streptococcus salivarius* quando comparadas com os outros grupos testados. Um estudo conduzido por Kovachev e Vatcheva-Dobrevska (2014) envolvendo 436 mulheres com candidíase vulvovaginal utilizou dois grupos de tratamento. O primeiro recebeu fluconazol (150 mg) e uma dose única de cápsula vaginal de fenticonazol (600 mg) no mesmo dia. Já o segundo grupo seguiu o mesmo protocolo com adição de probióticos vaginais contendo *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, administrados após o quinto dia do tratamento com os azóis. O uso de probióticos aumentou a eficácia da terapia assim como preveniu reincidivas de infecções vaginais por *C. albicans* (KOVACHEV; VATCHEVA-DOBREVSKA, 2014). Vicariotto et al. (2012) testaram uma formulação contendo duas linhagens de *Limosilactobacillus fermentum* LF10 (DSM 19187) e *Limosilactobacillus acidophilus* LA02 (DSM 21717), na forma tablet vaginal efervescente de liberação lenta, em mulheres com candidíase vulvovaginal. Os resultados mostraram que a formulação além de curar a infecção, promove uma defesa fisiológica longa através da formação de um ambiente anaeróbico e pela colonização e adesão dos dois probióticos.

2.3 COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS PRODUZIDOS POR *LIMOSILACTOBACILLUS*

As ações benéficas causadas por probióticos podem estar relacionadas à sua capacidade de modular a microbiota intestinal através da competição por sítios de adesão e pela produção de substâncias anti-microbianas, que podem apresentar efeitos imunomoduladores (DORON et al., 2008). Entre os principais compostos antimicrobianos produzidos por *Limosilactobacillus*, podemos citar: as bacteriocinas e microcinas, ácidos orgânicos, biossurfactantes e peróxido de hidrogênio.

Bacteriocinas e microcinas são pequenos peptídeos com atividade bactericida ou bacteriostática que podem ser produzidas tanto por probióticos como por bactérias comensais. Normalmente as bacteriocinas são secretadas por bactérias gram-positivas, enquanto microcinas são produzidas por bactérias gram-negativas e possuem tamanho menor que 10 kDa (JAMES; LAZDUNSKI; PATTUS, 2013). O modo de ação desses peptídeos é influenciado por diversos fatores, entre eles: dose do composto e grau de purificação, estado fisiológico das células indicadoras (fase de crescimento), e condições experimentais (temperatura, pH, presença de agentes perturbadores da integridade da membrana e outros compostos antimicrobianos) (DERAZ et al., 2007). A produção de bacteriocinas também pode ser modulada pela presença de outras bactérias gram-positivas, conforme demonstrado por Maldonado et al. (2004). Normalmente, as bacteriocinas possuem modo de ação restrito a linhagens próximas e agem aumentando a permeabilidade da membrana de bactérias gram-negativas, causando sua ruptura ou pode atuar na síntese da parede celular, resultando na formação de poros (WIEDEMANN et al., 2006; ZACHAROF; LOVITT, 2012). Hefzy et al. (2021) testaram moléculas semelhantes a bacteriocinas produzidas por diferentes probióticos, incluindo diversas espécies de *Limosilactobacillus*, contra diferentes espécies de *Candida*. A molécula produzida por *L. pentosus* apresentou maior espectro, inibindo 73,3% dos isolados de *Candida*, seguido de *L. paracasei* subsp. *paracasei* (68.9%), *L. rhamnosus* I (66.7%), *L. delbrueckii* subsp. *lactis* I (66.7%). Tais moléculas também foram responsáveis por reduzir em até 70,6% (*L. pentosus*) a formação de biofilme, além de aumentar a taxa de sobrevivência de *Galleria mellonella* infectadas com *Candida*. *L. plantarum* WZD3 produz uma bacteriocina com efeito contra crescimento de *C. albicans*, principalmente após passar por processo de purificação (MOHSIN; ALI, 2021)

Outro composto frequentemente produzido por *Limosilactobacillus* são os ácidos orgânicos, compostos orgânicos que retêm propriedades ácidas e a maioria deles consiste em ácidos carboxílicos (-COOH) (PAPATISIROS et al., 2013). São compostos principalmente de ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs) ($\leq C6$), também comumente referidos como ácidos

graxos de cadeia curta voláteis (VSCFA), como fumárico, propiônico, acético, láctico, butírico e outros, ou ácidos graxos de cadeia média (MCFA; C7 a C10) e ácidos graxos de cadeia longa (LCFA; \geq C11) (DITTOE; RICKE; KIESS, 2018). A atividade bactericida dos ácidos orgânicos depende principalmente de sua forma indissociada, pois podem permear através da membrana celular por difusão e liberar prótons na célula (RICKE, 2003). O influxo de prótons causa acidificação do citoplasma e alterações no potencial de prótons da membrana (CRAMER; PRESTEGARD, 1977; EKLUND, 1983; BROCKLEHURST; LUND, 1990). Essa perturbação da membrana plasmática pode aumentar a eficácia do tratamento com azóis, especialmente em *C. glabrata*, que apresenta resistência intrínseca a essas drogas (ZANGL et al., 2020). Noverr e Huffnagle (2020) demonstraram que *L. casei* LGG é capaz de inibir a colonização de *C. albicans* através da produção de ácido butírico, que inibe a morfogênese de levedura pra hifa. A produção de ácidos por *Limosilactobacillus* não segue um padrão, sendo possível encontrar maiores taxas de produção entre 72h a 120h de incubação (OGUNSHE; OMOTOSO; BELLO, 2011). A produção de ácido láctico por *Limosilactobacillus* também possui papel importante na imunoregulação, aumentando a quantidade de citocinas anti-inflamatórias, independente da mudança de pH, visto que experimentos somente acidificando o meio não produziram o mesmo efeito pelas células (HEARPS et al., 2014; HEARPS et al., 2017). Outra forma de atuação dos ácidos orgânicos no desenvolvimento de *Candida*, é sua capacidade de reduzir a síntese de RNA ribossomal e RNA, levando a um estado de inanição metabólica, após exposição prolongada, reduzindo transcrição, tradução e crescimento (COTTIER et al., 2015).

Os biossurfactantes estão entre um dos principais compostos produzidos por *Limosilactobacillus*, e consistem em moléculas anfipáticas com frações hidrofílicas e hidrofóbicas que compreendem uma ampla gama de estruturas químicas, como glicolipídeos, lipopeptídeos, complexos de polissacarídeo-proteína, fosfolipídeos, ácidos graxos e lipídeos neutros (LIN, 1996; DESAI; BANAT, 1997). Suas funções incluem o aumento na área de superfície e biodisponibilidade de substratos hidrofóbicos insolúveis em água, ligação de metais pesados, regulação de genes envolvidos na patogênese bacteriana, como alginato, LPS, elastase e a produção de protease LasA (RON; ROSENBERG, 2002), quorum-sensing e produção de biofilme (SINGH; CAMEOTRA, 2004). O fato de apresentarem atividade anti-adesivas sugere que estes compostos poderiam ser aplicados a dispositivos de assistência ao paciente, como tubos ou cateteres, com o objetivo de diminuir a colonização de locais por patógenos nosocomiais, representando, portanto, uma intervenção segura e eficaz para fins de controle de infecção (FALAGAS; MAKRIS, 2009). O biossurfactante isolado de *L. paracasei* ssp. *paracasei* A20 exibiu atividades antimicrobiana e anti-aderente contra um amplo espectro

de patógenos, incluindo *C. albicans*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus agalactiae* (GUDIÑA et al., 2010). Esses biossurfactantes podem ser utilizados em sinergismo para melhorar os efeitos antimicrobianos de alguns medicamentos, como vem sendo apontado por Abruzzo et al. (2018), Kulkarni; Chakraborty; Chakraborty (2019), Giordani et al. (2019). Abruzzo et al. (2021) relataram uma nova formulação que consiste lipossomos contendo biossurfactante produzido por *L. crispatus* BC-1, isolado da mucosa vaginal, recobertos com ácido hialurônico. Tal formulação apresentou uma boa estabilidade ao ser aplicada na cavidade vaginal e capacidade de diminuir a formação de biofilme de *Candida*.

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma espécie reativa de oxigênio (ROS) de produção rara por espécies de *Limosilactobacillus* devido à sua fraca tolerância ao oxigênio (FANG et al., 2018). No entanto, sua produção tem sido intimamente ligada às espécies de *Limosilactobacillus* vaginais e é um preditor de colonização prolongada da vagina (VALLOR et al., 2001). H_2O_2 atua aumentando a permeabilidade da membrana celular e destruindo estruturas moleculares básicas de ácidos nucleicos e proteínas celulares (KONG; DAVISON, 1980; DAHL et al., 1989; PIARD; DESMAZEAUD, 1991). Em outro estudo, foi sugerido que *L. delbrueckii* subsp. *lactis* T31 pode ser usado como cultura protetora na indústria de alimentos ou como probiótico para prevenir infecções intestinais e urogenitais; tal uso estava implícito em sua capacidade de produzir H_2O_2 (BATDORJ et al., 2007). A produção deste ROS por *L. crispatus* 2029 proporcionou um amplo espectro de atividade antagônica, aumentando a resistência à colonização de patógenos em infecções do trato urinário, como vaginose bacteriana e candidíase vulvovaginal (ABRAMOV et al., 2014). *L. crispatus* M247 usa H_2O_2 como uma molécula transdutora de sinal para induzir a expressão do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR), que desempenha um papel importante na mucosa intestinal e homeostase das células epiteliais, por meio de uma modulação direta da capacidade de resposta das células epiteliais a estímulos inflamatórios (VOLTAN et al., 2008). O H_2O_2 derivado de bactérias é responsável por manter e até melhorar a homeostase intestinal desde que as concentrações não ultrapassem uma determinada faixa fisiológica, caso contrário, pode levar à bacteremia (SINGH et al., 2018). Alguns autores sugerem que mesmo em concentrações que não sejam inibidoras de patógenos, o peróxido de hidrogênio pode reagir com outras substâncias formando compostos inibitórios como a hipotiocianita obtida pelo sistema lactoperoxidase (DE VUYST & VANDAMME, 1994). Outra possível função para H_2O_2 é que possui atividade anti-inflamatória, atuando nas células do hospedeiro através da ativação dos receptores ativado por proliferadores de peroxissoma gama, que possui papel essencial na regulação da inflamação intestinal e homeostase (HERTZBERGER et al., 2014).

C. albicans é mais susceptível a H₂O₂ quando comparadas com *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (RAMIREZ-QUIJAS; LOPEZ-ROMERO; CUELLAR-CRUZ, 2015), inclusive tem sido proposto que *C. parapsilosis* e *C. krusei* possuem resistência a H₂O₂ devido à presença de oxidase, uma enzima que faz parte de um caminho oxidativo alternativo (OLIVEIRA et al., 2012).

2.4 PROPRIEDADES PROBIÓTICAS DE *L. FERMENTUM*

Limosilactobacillus acidophilus e *L. fermentum* são predominantes no intestino humano e apresentam propriedades probióticas (CHEN et al., 2009). A presença desses microrganismos na microbiota intestinal tem sido associada com estado saudável do hospedeiro e baixos níveis podem estar relacionados com Síndrome do Intestino Irritável (LIU et al., 2017).

Diversos trabalhos vêm mostrando propriedades funcionais relacionadas com essa espécie, e *L. fermentum* tem se tornado um dos mais promissores probióticos, sendo utilizado como linhagem de referência em estudos comparativos com outros probióticos, devido às suas propriedades (RODRÍGUEZ-SOJO et al., 2021). Essa espécie já foi isolada de diversos locais incluindo: materiais de plantas fermentadas, laticíneos, pães, salsichas fermentadas naturalmente, leite humano, saliva e fezes humanas (RODRÍGUEZ-SOJO et al., 2021). Seus benefícios têm sido observados tanto em estudos pré-clínicos (*in vitro* e *in vivo*) como em estudos clínicos com humanos (Tabela 1).

Tabela 1. Propriedades de linhagens de *L. fermentum* já descritas em outros trabalhos.

Linhagem	Propriedade	Referência
CECT 5716	Modulação da resposta imune do hospedeiro	MARTÍNEZ-ABAD et al., 2016
	Aumento da resposta à vacinação contra influenza em adultos	OLIVARES et al. 2007
	Redução da carga de <i>Staphylococcus</i> em leite materno de mães lactantes	MALDONADO-LOBON et al., 2015
	Redução da incidência de infecção respiratória e gastrointestinal em crianças	MALDONADO et al., 2012
DR 9	Efeito antioxidante (via aumento da regulação de produção de oxoprolina) e efeito imunomodulatório em ratos senescentes	HOR et al., 2019; HOR et al., 2021
	Previne encurtamento de telômero em ratos senescentes	LEW et al., 2019
3872	Potencial para combater infecções por <i>Campylobacter jejuni</i>	LEHRI, B.; SEDDON, A.; KARLYSHEV, 2017
	Possui uma proteína ligadora de colágeno única, codificada por gene <i>cbp</i> com 5 repetições do “domínio B” (enquanto outros <i>Limosilactobacillus</i> possuem apenas 4 domínios)	LEHRI, B.; SEDDON, A.; KARLYSHEV, 2014
AGR1485	Capacidade de aumentar a resistência elétrica transeptelial (TEER) em camadas de células Caco-2, aumentando portanto, a integridade da barreira e protegendo contra infecções de enteropatógenos	ANDERSON et al., 2010
MCC 2760	Redução de colesterol, alto potencial antioxidante e ação anti-inflamatória	ARCHER; HALAMI, 2015; ARCHER et al., 2018

A linhagem *L. fermentum* CECT 5716, isolada de leite humano, apresentou atividades imunomodulatórias, anti-inflamatórias e antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, sendo capaz de aumentar resposta imune natural e adquirida através da ativação de células T e NK e indução de citocinas (PÉREZ-CANO et al., 2010). Essa linhagem é sensível a todos os antibióticos e não possui genes de resistência que possam ser transmitidos, portanto vem sendo utilizada em produtos como complemento alimentar e leite para crianças (ALE et al., 2020). Em estudos clínicos apresentou resultados positivos prevenindo sintomas relacionados à mastite lactacional, diminuição de infecções gastrointestinais e respiratórias em crianças e melhoramento da resposta vacinal (RODRÍGUEZ-SOJO et al., 2021).

L. fermentum MCC2760 possui propriedades de adesão a células *in vitro* e imunoregulação através da expressão de genes relacionados à produção de IL-6, IL1 β e IL-10, e supressão de TNF α (ARCHER; KURREY; HALAMI, 2018), redução de colesterol e alto potencial antioxidativo (ARCHER; HALAMI, 2015), inclusive em modelos *in vivo* (ARCHER; MUTHUKUMAR; HALAMI, 2021).

Por outro lado, a linhagem *L. fermentum* GMNL-296 foi recentemente patenteada em uma composição capaz de melhorar sintomas de infecções causadas por *Clostridium difficile*, um dos principais patógenos causadores de diarreia em pacientes com antibioticoterapia, enquanto que *L. fermentum* L23 apresentou efeito terapêutico após administração vaginal em fêmeas de camundongo BALB/c infectadas com *Gardnerella vaginalis* (DANIELE; PASCUAL; BARBERIS, 2014).

A atividade antimicrobiana também tem sido demonstrada em *L. fermentum* contra diversos microrganismos, tais como: *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* também foram demonstradas em diversos outros trabalhos (MELO et al., 2016; RAMOS et al., 2013; VELJOVIC et al., 2017).

Além da atividade antimicrobiana, outras propriedades têm sido atribuídas à espécie *L. fermentum*. A linhagem *L. fermentum* IM-12, apresentou efeito imunomodulador através da supressão de IL-6 em macrófagos, além de atividade anti-inflamatória em camundongos com colite (LIM et al., 2017). Outra linhagem, *L. fermentum* L930BB promoveu a diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 and IL-12) e aumentou IL-10, uma citocina anti-inflamatória (ČITAR et al., 2015).

Algumas linhagens também estão relacionadas com atividades anti-câncer e melhoramento da longevidade. Shokryazdan et al. (2017) mostrou que a linhagem *L. fermentum* HM3 apresentou atividade citotóxica contra células tumorais e mostrou seletividade a este tipo celular em detrimento de células normais. Wei et al. (2019)

observaram que a linhagem *L. fermentum* YL-11 produz um exopolissacarídeo que possui atividade antitumoral quando testado nas células de câncer de cólon HT-29 e Caco-2. Estudo com *L. fermentum* JDFM216 mostrou que essa linhagem foi capaz de aumentar a longevidade e resposta imune de *Caenorhabditis elegans* (JANG et al., 2017; PARK et al., 2018). Além disso, outros trabalhos demonstraram que esta espécie é frequentemente encontrada no microbioma intestinal de idosos saudáveis (SILVI et al., 2003; PARK et al., 2015). A linhagem *L. fermentum* DR9 foi responsável por promover uma atividade antioxidante através do aumento da regulação de 5-oxoprolina (ácido L-piroglutâmico), diminuída em camundongos senescentes, além de prevenir a diminuição de telômeros em outro estudo com camundongos (HOR et al., 2018; HOR et al., 2019). Também foi observada a capacidade dessa linhagem em reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β) em músculos e ossos de ratos que tiveram processo de envelhecimento induzido por D-galactose (HOR et al. 2021).

Vários estudos indicaram que a produção de exopolissacarídeos (EPS) por espécies de *Limosilactobacillus* pode contribuir para saúde humana por contribuírem para o seu papel como probiótico, tais como: induzirem modulação do sistema imune, apresentarem atividade antioxidante e antitumor, serem capazes de diminuir colesterol, entre outros (RUAS-MADIEDO et al., 2010; CASTRO-BRAVO et al., 2018). *L. fermentum* também é capaz de produzir EPS, que pode ser secretada no meio ou permanecer aderida à parede celular. EPS produzida por *L. fermentum* Lf2 mostrou uma possível atividade prebiótica devido ao aumento da produção de SFCA (produzido no catabolismo de carboidratos prebióticos por bactérias benéficas da microbiota) nas fezes de camundongos testados, sugerindo que pudesse ser utilizado com ingrediente funcional na formulação de alimentos (ALE et al., 2019). *L. fermentum* S1 produz EPS que permanece aderido à superfície celular e possui atividade antioxidante demonstrada *in vitro*, além de apresentar uma alta temperatura de degradação, podendo ser utilizado na indústria alimentar (WANG et al., 2019b). *L. fermentum* MTCC 5898 também é responsável pela produção de EPS que permanece aderido à parede celular e apresenta efeito antioxidante (BHAWAL et al., 2021). O exopolissacarídeo purificado produzido por *L. fermentum* UCO-979C foi responsável por reduzir a adesão de *H. Pylori* em células AGS (células epiteliais de adenocarcinoma gástrico humano), além de aumentar os níveis de TNF- α , IL-6, IL-10 em células AGS e diminuir os níveis de TNF- α , IL-6 e IL-8 em células AGS infectadas por *H. pylori*. Além disso, essa linhagem foi responsável por melhorar a resistência a infecção por *H. pylori in vivo* através da modulação da resposta imune em camundongos, reduzindo os níveis de IL-8 e TNF- α e aumentando IL-10 em camundongos infectados (GARCIA-CASTILLO et al., 2020).

Nem sempre a utilização de probióticos causa benefícios ao hospedeiro, como é o caso da linhagem *L. fermentum* AGR1487, isolada de um paciente saudável, posteriormente diagnosticado com doença do intestino irritável (ANDERSON et al., 2013). Essa linhagem apresentou efeito negativo em modelo representando a integridade da barreira intestinal *in vitro*, diminuindo em até 97% a resistência transepitelial elétrica, causando efeito negativo nas junções entre células epiteliais adjacentes (ANDERSON et al., 2013). Tal efeito é obtido através da super-expressão de genes codificantes de síntese de tubulina e de proteínas associadas a formação de microtúbulos (ANDERSON et al., 2013). No mesmo trabalho foi observado efeito positivo em relação a *L. fermentum* AGR1485, capaz de aumentar a integridade da barreira intestinal *in vitro* (ANDERSON et al., 2013). Por esse motivo é importante um estudo aprofundado de possíveis linhagens probióticas a fim de evitar linhagens que causem prejuízos ao hospedeiro.

L. fermentum 3872 foi isolado a partir do leite materno de paciente saudável e possui capacidade de produzir ácido lático e peróxido de hidrogênio, além de aderir a células bucais e HeLa (ABRAMOV et al., 2014). A análise do genoma mostrou a presença de genes responsáveis pela sobrevivência da bactéria no trato gastrointestinal, além de proteínas potencialmente envolvidas na interação com fibronectina, mucina e colágeno (LEHRI; SEDDON; KARLYSHEV, 2015; LEHRI; SEDDON; KARLYSHEV, 2017a). Lehri, Seddon, Karlyshev (2017b) confirmaram a afinidade de *L. fermentum* 3872 de se ligar a colágeno do tipo I e observaram que pode haver uma competição por sítios de adesão com *Campylobacter jejuni* na célula do hospedeiro. Esse trabalho nos mostra como a caracterização gênica pode servir de ferramenta para verificar possíveis propriedades e assim, iniciar testes *in vitro* direcionados.

2.5 ANÁLISE GENÔMICA COMO FERRAMENTA DE CARACTERIZAÇÃO DE PROBIÓTICOS

A análise genômica vem focando principalmente na predição de recursos metabólicos, baseando-se em anotação funcional, composição do genoma e locus conservados. Entretanto, é preciso identificar novos alvos independentemente de uma classificação funcional para que se encontre respostas para perguntas como: o que permite alocar organismos em diferentes nichos e quais genes estão envolvidos em capacidades metabólicas únicas? Como novos alvos podem ser selecionados para identificar características únicas? (KLAENHAMMER et al., 2008).

Devido à sua importância econômica, diversos especialistas vêm estudando o genoma de probióticos e tais estudos demonstram uma relação entre tamanho do genoma e especialização a nichos ecológicos (PAPIZADEH; POURSHAFIE, 2017). Acumulação de pseudogenes e elementos de inserção de sequência e diminuição do conteúdo de GC são características de uma minimização do genoma, característica da evolução de *Limosilactobacillus*, que possuem nicho especializado e estreita distribuição (PAPIZADEH; POURSHAFIE, 2017).

Bactérias produtoras do ácido lático (BALs) são organismos com baixo conteúdo de GC (33% a 50%), com genomas relativamente pequenos, abrangendo desde 1.3 – 2.0 Mb para *L. helveticus*, *L. sakei*, *L. gasseri*, e *L. johnsonii* até 3.3 Mb para *L. plantarum*, indicando que os menores possuem habitat restrito, enquanto os com maiores genomas possuem habitat generalista (KLAENHAMMER et al., 2008; PAPIZADEH; POURSHAFIE, 2017).

Recentemente algumas espécies do gênero *Lactobacillus* sofreram uma alteração em sua taxonomia e passaram a constituir espécies de outros gêneros (ZHENG et al., 2020). Tal alteração se deve ao fato de que o gênero era bem amplo, polifilético e compreendia pelo menos outros 5 gêneros (WITTOUCK, WUYTS, LEBEER, 2019). Alguns autores mostraram que o gênero *Lactobacillus* possuía 10 filogrupos monofiléticos e 4 desses grupos não apresentavam o requisito comum de compartilhar >50% de proteínas conservadas (POCP) (QIN et al., 2014). A partir da nova classificação sugerida por Zheng et al. (2020), o gênero *Lactobacillus* foi reclassificado em 25 novos gêneros que compartilham propriedades ecológicas e metabólicas, incluindo o gênero *Limosilactobacillus*.

O sequenciamento genômico é uma técnica que vem sendo amplamente implementada em laboratórios de pesquisa e quando utilizada para microbiologia clínica promove uma rápida detecção e identificação de um microrganismo, que pode ser combinado com o teste de susceptibilidade antimicrobiana (TAGINI; GREUB, 2017). Por esse motivo, o sequenciamento genômico pode ser utilizado em vários aspectos da microbiologia clínica, incluindo controle de doenças infecciosas e epidemiologia de patógenos (LOMAN et al., 2012; TANG et al., 2017).

No ramo da microbiologia alimentar, a rapidez e o baixo-custo dos métodos de sequenciamento mais atuais (*next generation sequencing* - NGS) tem permitido mostrar a diversidade genômica entre espécies de microrganismos, identificar o perfil de comunidades microbianas, bem como elucidar mecanismos moleculares de funcionalidades em ecossistemas alimentares (SOLIERI; DAKAL; GIUDICI, 2012).

A existência de uma única sequência genômica é inadequada para descrever a complexidade de espécies, gênero e suas inter-relações. São necessárias várias sequências

genômicas para representar a variabilidade genética de espécies microbianas, dessa forma pode-se avaliar e detectar variações genéticas individuais responsáveis por mutações fenotípicas ou propriedades funcionais. Esse processo auxilia na diferenciação de linhagens produtoras de toxinas das não-produtoras, linhagens selvagens e linhagens otimizadas para processos industriais. A comparação dos diversos perfis genômicos pode auxiliar a identificar taxas de mutação na evolução de população e sua correlação da adaptação (SOLIERI; DAKAL; GIUDICI, 2012).

No caso de probióticos, a análise genômica permite prever se o microrganismo possui genes associados na produção de moléculas antimicrobianas e vitaminas, genes que auxiliem na resistência a situações de estresse como a passagem pelo trato gástrico e, portanto, enzimas digestivas. Também permite verificar a presença de genes relacionados com a adesão, os quais possibilitariam a colonização do trato gastrintestinal ou de outro sítio anatômico. Todos esses fatores são importantes na escolha de um bom probiótico e oferecem suporte na escolha da linhagem apropriada.

3 CAPÍTULO I

Artigo publicado na revista Journal of Fungi, revista que possui fator de impacto 5.816

Article

Genomic analysis of *Limosilactobacillus fermentum* ATCC 23271, a potential probiotic strain with anti-*Candida* activity

Camilla Itapary dos Santos ¹, Carmem D. L. Campos ², Wallace R. Nunes-Neto ¹, Monique S. do Carmo ³, Flávio A. B. Nogueira ³, Rômulo M. Ferreira ², Ennio P. S. Costa ¹, Laoane F. Gonzaga ², Jéssica M. M. Araújo ², Joveliane M. Monteiro ², Cinara Regina A. V. Monteiro ³, Fernanda S. Platner ^{4,5}, Isabella F. S. Figueiredo ^{4,5}, Rodrigo A. Holanda ², Silvio G. Monteiro ³, Elizabeth S. Fernandes ^{4,5}, Andrea S. Monteiro ², Valério Monteiro-Neto ^{1,3*}

- ¹ Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal – BIONORTE, 65.055-310, São Luís, Maranhão, Brazil; camilla_itapary@hotmail.com (C.I.S); wallaceneto2010@hotmail.com (W.R.N.-N.); enniocosta45@gmail.com (E.P.C.S.); valerio.monteiro@ufma.br (V.M.-N.)
- ² Mestrado em Biologia Microbiana – Universidade CEUMA, 65.075-120, São Luís, Maranhão, Brazil; carmemcampos01@hotmail.com (C.D.L.C.); romulo.ferreira5@hotmail.com (R.M.F.); laoane_freitas@hotmail.com (L.F.G.); jessicamendesaraujo1@hotmail.com (J.M.M.A.); jovelianemello53@gmail.com (J.M.M.); rodrigo.holanda (R.A.H.); andreasmont@gmail.com (A.S.M.)
- ³ Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – Universidade Federal do Maranhão, 65080-805 São Luís, Maranhão, Brazil; carmo.monique (M.S.C.); augustofabn@gmail.com (F.A.B.N.); cinaraaragao@hotmail.com (C.R.A.V.M.); silvio.gm@ufma.br (S.G.M.); valerio.monteiro@ufma.br (V.M.-N.)
- ⁴ Faculdades Pequeno Príncipe – FPP, 80230-020, Curitiba, Paraná, Brazil; fsilvaplatner@gmail.com (F.S.P.); bellaafigueiredo@hotmail.com (I.F.S.F.); elizabeth.fernandes@pelepequenoprincipe.org.br (E.S.F.)
- ⁵ Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe – IPPPP, 80250-060, Curitiba, Paraná, Brazil; fsilvaplatner@gmail.com (F.S.P.); bellaafigueiredo@hotmail.com (I.F.S.F.); elizabeth.fernandes@pelepequenoprincipe.org.br (E.S.F.)

* Correspondence: valerio.monteiro@ufma.br; Tel.: +55 98 3272 9591

Citation: Lastname, F.; Lastname, F.; Lastname, F. Title. *J. Fungi* **2021**, *7*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Firstname Lastname

Received: date
Accepted: date
Published: date

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



Copyright: © 2021 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: *Limosilactobacillus fermentum* (ATCC 23271) was originally isolated from the human intestine and has antimicrobial activity, primarily against *Candida* species. Complete genome sequencing and comparative analyses were performed to elucidate the genetic basis underlying its probiotic potential. The ATCC 23271 genome was found to contain 2,193,335 bp, with 2,123 protein-coding sequences. Phylogenetic analysis revealed that the ATCC 23271 strain shares 941 gene clusters with six other probiotic strains of *L. fermentum*. Putative genes known to confer probiotic properties have been identified in the genome, including genes related to adhesion, tolerance to acidic pH and bile salts, tolerance to oxidative stress, metabolism and transport of sugars and other compounds. A search for bacteriocin genes revealed a sequence 48% similar to that of enterolysin A, a protein from *Enterococcus faecalis*. However, in vitro assays confirmed that the strain has inhibitory activity on the growth of *Candida* species and also interferes with their adhesion to HeLa cells. *In silico* analyses demonstrated a high probability of the protein having antimicrobial activity. Our data reveal the genome features of *L. fermentum* ATCC 23271, which may provide insight into its future use given the functional benefits, especially against *Candida* infections.

Keywords: probiotic; genomic characterization; *Limosilactobacillus fermentum*; *Candida* infection

1. Introduction

Candida species are considered as commensal microorganisms in humans [1]. Nevertheless, they can cause opportunistic infections, including some that are less severe and superficially located, and others of a life-threatening systemic nature, particularly in immunocompromised patients. Localized candidiasis mainly affects the mucosa of the oral cavity and vagina [2, 3].

Azoles are commonly used to treat candidiasis [4]. These drugs are fungistatic, meaning that an efficient immune system is necessary to control the infection and resolve its symptoms [5]. Other classes of antifungals may also be indicated, particularly when the etiologic agent is resistant to azoles, including nystatin, amphotericin B, flucytosine or echinocandins [6, 7]. Thus, there is a need for new effective therapeutic approaches for candidiasis.

According to The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics, probiotics are defined as “live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit to the host” [8]. A probiotic formulation can be administered as a single microorganism or in association with different species. In addition, probiotics may be mixed with prebiotics to enhance their benefits. For human use, a probiotic should preferably be of human origin, safe, and free of genetic vectors capable of transferring antibiotic resistance and/or virulence genes. They must have the ability to survive in adverse host conditions (such as acidic pH, enzymes, and bile acids) and to adhere to eukaryotic cells [9]. Probiotics can exhibit antagonism against microbial pathogens, stimulate the host immune system, or confer other proven beneficial effects [8, 10].

Health benefits have been reported in both human clinical trials and animal studies. The benefits include: the reduction of antibiotic-associated diarrhea and rotavirus diarrhea [11], preventive and adjuvant therapy in the treatment of certain cancer types [12-14], immunological modulation [15], improved response to vaccination [16], adjuvant action in the treatment of *Helicobacter pylori* infections [17], relief of irritable bowel syndrome [18],

treatment and prevention of allergies [19], in addition to preventing type 1 diabetes in animal models [20].

The benefits produced by probiotics may be related to their ability to regulate the microbiota through competition for adhesion sites, as well as the production of soluble compounds, which can also have immunomodulatory or antimicrobial effects [21]. The modulation of the immune system by probiotics can result in enhanced antibody-mediated responses, reduced inflammation, increased phagocytosis, in addition to several other responses [22, 23].

Many genera of bacteria (and yeasts) have been proposed as probiotics, but the most commonly used are *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species [24, 25]. *Lactobacillus* is the most complex genus among lactic acid bacteria (LAB) and represents a defined group of gram-positive, non-spore-forming rods or coccobacilli, which are fermentative, aerotolerant, or anaerobic with a G + C content usually below 50 mol% [25]. The genus is included in the phylum Firmicutes and has recently been reclassified into 25 genera [26].

Lactobacillus fermentum has also undergone a change in its taxonomy, changing its name to *Limosilactobacillus fermentum* [26]. This species has been detected in human milk and feces, animal feces, plant tissues, and dairy foods [27-34]. Some of the beneficial effects of this species, which are strain-specific, have already been described. These effects include reduction of cholesterol, prevention of community-acquired intestinal and upper respiratory infections, antioxidant potential, anti-aging action, anti-inflammatory activity, immune system stimulation, and antimicrobial activity [27-30, 32, 33, 35, 36]. In our previous study, the *L. fermentum* ATCC 23271 strain, originally isolated from the human intestine, exhibited capability to adhere to eukaryotic cells, mucin binding ability, and inhibitory activities on the growth and cell adherence of genital pathogens, principally *Candida* species [37]. Thus, in order to gain further insight into the genetic basis of the probiotic potential of the *L. fermentum* ATCC 23271 strain, we sequenced its whole genome. We also compared its genome with the genomes of other *L. fermentum* strains in an attempt to identify its possible mechanisms of action.

2. Materials and Methods

2.1 Bacterial strains and growth conditions

The following microorganisms were used in this study: *L. fermentum* ATCC 23271, enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) 17.2, *E. faecalis* (ATCC 29212), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis (ATCC 13076), *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* SC 5314, *Candida krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. albicans* 44 (oral isolate), *C. albicans* CAS (vaginal isolate), *C. krusei* GJFD (vaginal isolate), *C. parapsilosis* FSG (oral isolate), and *C. parapsilosis* RCL (vaginal isolate). Probiotic properties were also evaluated against clinical *Candida* strains isolated from oral and vaginal cavities, belonging to the Culture Collection Sector of the Biology Laboratory of the Federal Institute of Education, Science and Technology of Maranhão. *L. fermentum* ATCC 23271 strains were cultivated in De Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) agar and broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) under anaerobic conditions, while the other bacteria and yeasts were grown in brain heart infusion (BHI) agar/broth and Sabouraud agar, respectively (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) under aerobic conditions. All microorganisms were incubated at 37 °C for 24 h.

2.2 Whole genome sequencing of *Limosilactobacillus fermentum* ATCC 23271

Genome sequencing of *L. fermentum* ATCC 23271 was performed by Neoprosperta using the Illumina HiSeq4000. Genomic DNA was extracted using the PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, USA), according to the manufacturer's instructions. The complete genome was sequenced using the Illumina MiSeq paired library approach and prepared using the Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA, USA). The sequence readings were assembled using A5 software [38] and processed for adapter cutting, quality filtering, and error correction to generate the contigs and scaffolds. In addition, the CAP3 software [39] was used to improve the scaffolding assembly, cut low-quality regions, and correct erroneous links between contigs. The pre-assembled genomic DNA sequences were annotated using the software tool Prokka [40].

2.3 Genome analysis

The annotated sequences of the *L. fermentum* ATCC 23271 genome were analyzed using Rapid Annotation using Subsystem Technology (RAST) (available at

<https://rast.nmpdr.org/rast.cgi>). The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) was used to search for similarities in the protein databases of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and Universal Protein Resource. Phaster (<https://phaster.ca/>) was used to search for prophage-like clusters. Orthovenn (<http://probes.pw.usda.gov/OrthoVenn>) was used to search for orthologous proteins common to the lineages *L. fermentum* 2760, *L. fermentum* DR 9, *L. fermentum* 3872, *L. fermentum* CECT 5716, and *L. fermentum* AGR 1485 [41]. To search for genes associated with bacteriocins, the BAGEL4 program (available at <http://bagel4.molgenrug.nl/>) was used, and a protein with similarity to another known bacteriocin was first analyzed using the Signal P 5.0 Server to identify the signal peptide cleavage region. The mature protein sequence was analyzed in the CAMP database using four machine learning algorithms, including: Support Vector Machine, Random Forest, Artificial Neural Network, and Discriminant Analysis, to predict its antimicrobial activity [42]. A phylogenetic tree was generated using the nucleotide sequence using the TYGS server (<http://tygs.dsmz.de>) [43] using genomic sequences deposited in GenBank. To analyze evolutionary relationships between species, Mauve linked in Geneious software [44] was used. PathogenFinder v. 1.1 [45] was used to estimate the pathogenicity of the strain in human hosts. ResFinder v. 3.1 [46] and the Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) v. RGI 5.1.0, CARD 3.0.7 [47] were used to search for antimicrobial resistance genes. Virulence determinants were analyzed using VirulenceFinder v. 2.0 [48]. The rapid identification and annotation of prophage sequences within the genome of *L. fermentum* ATCC 23271 was performed using the phage search tool enhanced release (PHASTER) [49] The CRISPR Finder tool was used to detect CRISPR direct repeats and spacers [50].

2.4 Antagonism assay

Antagonism tests were performed using the overlay method [37]. *L. fermentum* ATCC 23271 grown on MRS agar was standardized at $OD_{600nm} = 0.1$, in MRS broth, and then 5 μ L of the inoculum was spotted (about 0.9 cm) on MRS agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) and incubated for 48 h under the same conditions. After that period, a 2 mm layer of Muller-Hinton agar (Difco Laboratories) was added onto MRS agar, and the standard pathogen inoculum (1×10^8 CFU/mL) was seeded. Petri dishes were incubated at 37 °C

for 24 h under aerobic conditions, and subsequent zones of inhibition were measured.

2.5 Interference on cell adhesion

Cell adhesion experiments were performed was carried out with *Candida* spp. by using HeLa (ATCC CCL-2) cell line yeast, respectively [51], with minor modifications [37]. Cultivation was carried out in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldrich) culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich) and 1% antibiotic and antimycotic solution, incubated in 5% CO₂, at 37 °C in a humidity-controlled environment. The cells were seeded in 24-well plates at a concentration of 1×10^5 cells/well and left to reach 80%–90% confluence. Then, the microorganisms were added at concentrations of 1×10^6 cells/well of pathogens and 1×10^8 cells/well of *L. fermentum* ATCC 23271. The tests were performed in three different ways: by adding the two microorganisms at the same time (competition); first, *L. fermentum* ATCC 23271 for 1 h and then pathogens (exclusion), or first pathogens for 1 h followed by *L. fermentum* ATCC 23271 (displacement). The plates were incubated for 4 h, and then dilution and plating were performed for CFU counts after incubation on Sabouraud agar.

2.6 Tolerance to gastrointestinal conditions

The tolerance of *L. fermentum* ATCC 23271 to acidic pH (pH = 2 and 4) and bile salts (0.5% and 1%, Oxgall, Sigma-Aldrich) was verified as described by Monteiro et al. [52]. Initially, 900 µL MRS (Difco Laboratories) was adjusted to pH 2 or 4, or supplemented with 0.5% or 1% (w/v) Oxgall (Sigma-Aldrich). The medium without modifications was used as a control. An aliquot of 100 µL of a 24 h culture of *L. fermentum* ATCC 23271, previously washed with PBS, was inoculated into tubes containing modified or unmodified MRS. After incubation at 37 °C for 3 h under anaerobic conditions, the percentage of viable bacteria was calculated by counting CFUs on MRS agar (Difco Laboratories).

2.7 Antibiotic susceptibility test

Antibiotic susceptibility assays were performed using the modified agar diffusion method, using commercial discs (Thermo Scientific™ Oxoid™) containing different antibiotics, including cefoxitin (30 µg), cefazolin (30 µg),

chloramphenicol (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), clindamycin (2 µg), erythromycin (15 µg), gentamicin (120 µg), linezolid (30 µg), nitrofurantoin (300 µg), oxacillin (1 µg), penicillin G (10 µg), rifampicin (5 µg), sulfazotrim (25 µg), tetracycline (30 µg), tigecillin (15 µg), and vancomycin (30 µg). *L. fermentum* ATCC 23271 overnight culture (37 °C in anaerobiosis) was standardized and inoculated on MRS agar medium, as previously described [53]. Subsequently, antimicrobial discs were placed, and the plates were incubated anaerobically at 37 °C for 24 h. The inhibition zone diameter of bacterial growth was measured (in mm) and susceptibility was assessed according to Charteris et al. [53].

2.8 Ethical aspects

Clinical microbial strains were obtained from a previous research project approved by the Ethics Committee of CEUMA University (Nº 2.519.446/2018/CEP-UNICEUMA).

2.9 Statistical analysis

Data analysis was performed using GraphPad Prism Software 5.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Student's *t*-tests were performed to assess differences in the adhesion assays when the *Candida* strains were assayed alone or in the presence of *L. fermentum* ATCC 23271. All experiments were performed in triplicate on three independent days, and statistical significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. General genome features and comparative analysis

To search for the genetic basis of the probiotic properties of interest, the genome of *L. fermentum* ATCC 23271 was sequenced. The genome was deposited in the NCBI database under the BioProject accession number PRJNA729474. Raw reads were deposited in the Sequence Read Archive (SRA) under the accession number SRX10856814. The assembled genome sequence was deposited in DDBJ/ENA/GenBank under the accession number GenBank: JAHBRU000000000.1.

Preliminary annotation data for the *L. fermentum* ATCC 23271 genome are listed in Table 1. The genome contains 2,123 protein-coding sequences (CDS).

Table 1. Characteristics of the assembly of *L. fermentum* ATCC 23271 genome

Attribute *	Indicators
Genome size (bp)	2,193,335
G+C content (%)	50.9
N50	33,843
L50	22
Number of contigs (with PEGs)	223
Number of subsystems	312
Prophage-like clusters	2
CDS	2,387
CDS (with proteins)	2,123
N° of RNAs	79
N° of tmRNA operons	1
N° of tRNA	55
N° of rRNA	21
N° of CRISPR loci	2

* Genome sequencing was performed using Illumina libraries designed using shotgun sequencing (Nextera). Genome annotation was performed automatically using the PROKKA tool.

The RAST analysis showed the presence of 2,123 coding sequences distributed in 312 subsystems, of which 1,614 were related to non-hypothetical proteins and 509 to hypothetical proteins. These genes were found to be associated with several subsystems (Figure 1). Through image analysis, it was seen that the subsystems with the highest number of genes are related to the production of cofactors, vitamins, prosthetic groups, pigments, protein metabolism, amino acids, and carbohydrates.

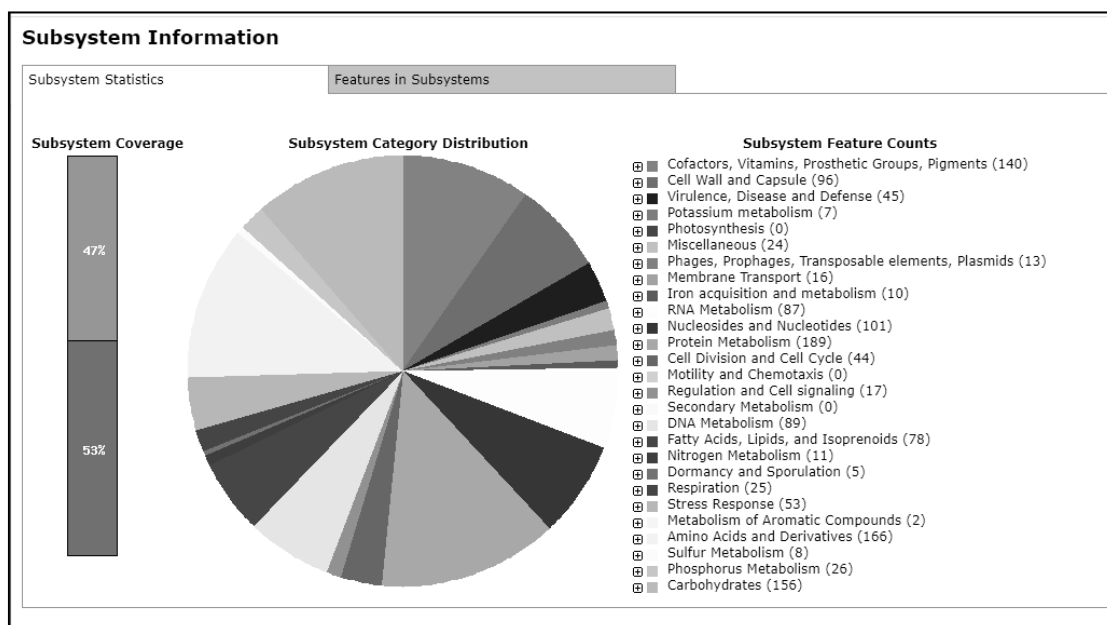


Figure 1. Categories of subsystems of the *L. fermentum* ATCC 23271 genome annotated by RAST.

The genome of *L. fermentum* ATCC 23271 was compared with the whole genomes of other *L. fermentum* strains in GenBank using the OrthoVenn web platform. The species formed 2,183 gene clusters, of which 1,262 belonged to at

least two species and 921 presented themselves in a single copy. It was also observed that *L. fermentum* ATCC 23271 shares 941 orthologous clusters with all the other tested strains, and that it has 13 exclusive gene clusters (Figure 2).

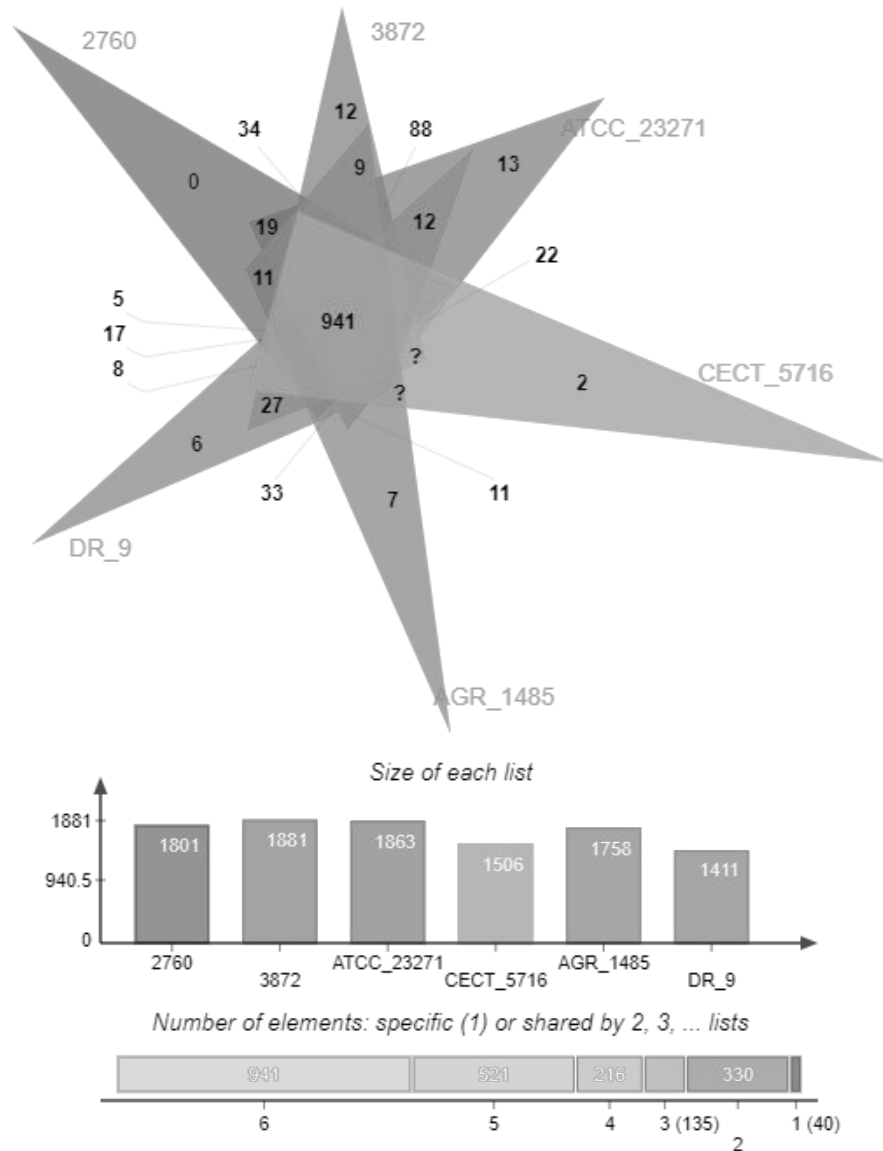


Figure 2. Venn diagram representing the groupings of orthologous genes shared between the following lineages of *L. fermentum*: ATCC 23271, 2760, 3872, CECT 5716, AGR 1485, and DR 9.

The 941 shared clusters involved a total of 5,704 proteins with each strain coding for approximately 16% of these proteins (Figure 3).



Figure 3. Overlays identified by the OrthoVenn 2 analysis of *L. fermentum* strains ATCC 23271, 2760, 3872, CECT 5716, AGR 1485, and DR 9.

Most proteins of these 941 clusters were found to be involved in the biological processes of chemical reactions and their pathways and cell division processes (Figure 4).

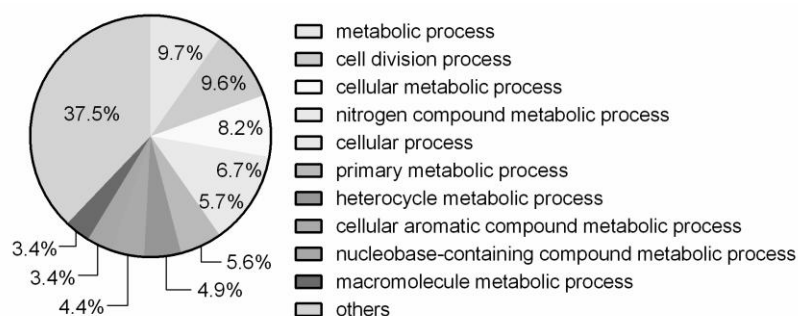


Figure 4. Processes related to proteins belonging to the clusters shared by the *L. fermentum* strains ATCC 23271, 2760, 3872, CECT 5716, AGR 1485, and DR 9.

With regard to molecular functions, 13.8% of the identified proteins are involved in hydrolase activity; 12.7% are related to a biochemical activity or are components of a larger process; and 10% were responsible for the transport of substances inside, outside, and between cells (Figure 5).

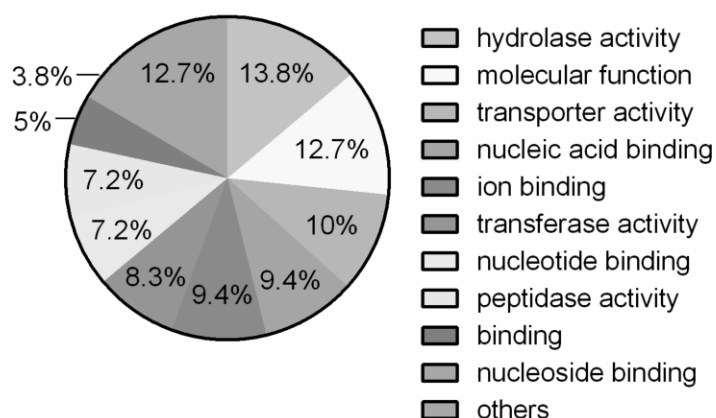


Figure 5. Molecular functions related to proteins belonging to the shared clusters by *L. fermentum* strains ATCC 23271, 2760, 3872, CECT 5716, AGR 1485, and DR 9.

The third group of proteins is related to the cellular components. In this group, most of the proteins comprised cell compartments (Figure 6).

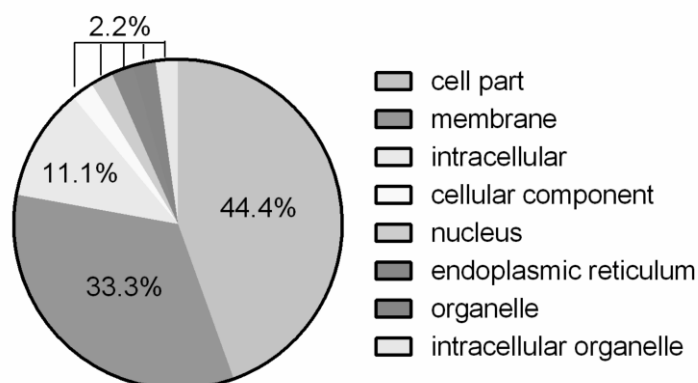


Figure 6. Cell components related to proteins belonging to the shared clusters of *L. fermentum* strains ATCC 23271, 2760, 3872, CECT 5716, AGR 1485, and DR 9.

Using the reference genomes and other sequences available in the TYGS database, a phylogenetic tree was constructed (Figure 7). Phylogenetic tree analysis showed that ATCC 23271 strain was the first species to appear during the evolutionary process. *Oenococcus oboholitolerans* CBAS 474 was used as the outgroup and, therefore, the most distant on the evolutionary scale among all analyzed species and strains. *L. cellobiosus* DSM 20055 was also found to be inserted within the clade with other *L. fermentum* strains. The clade formed by *L. fermentum* had a 97% confidence level. *L. fermentum* ATCC 23271 was found to be more closely related to *L. cellobiosus* DSM 20055, within the clade, whereas the nearest outside species of the clade was *L. gorillae* KZ01.

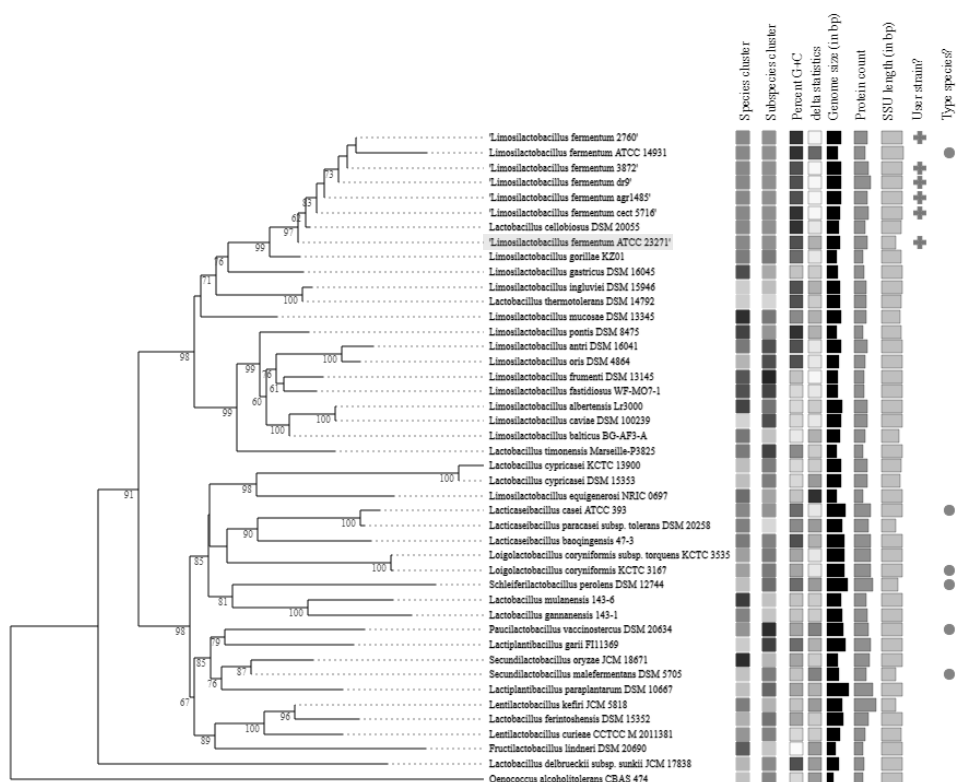


Figure 7. Phylogenetic tree of *Limosilactobacillus fermentum* ATCC 23271 and other bacterial genera available in the TYGS database. The tree was inferred using FastME 2.1.6.1 from ribosomal DNA. Branch lengths are scaled using the GBDP distance formula d5. The numbers above the branches are GBDP pseudo-bootstrap support values > 60% of 100 replications, with an average branch support of 19.2 %. The tree was rooted at the midpoint.

Among the 13 exclusive clusters of *L. fermentum* ATCC 23271, OrthoVenn 2 analysis revealed 37 proteins that were most related to transposition. However, manual analysis

showed only 16 ORFs, which included seven encoding transposases and six encoding hypothetical proteins, of which one sequence showed similarity to a *L. reuteri* hypothetical protein, two sequences that did not show similarity to any described protein, and one encoded a chloride transporter, as evidenced by UniProt analysis.

3.2. Putative genes associated with probiotic properties

Genes for the following probiotic features were searched within the genome: tolerance to stress conditions, production of lactic acids, production of adhesion structures, production of antimicrobial peptides, and safety for human use. Genomic analysis detected 21 genes encoding proteins that may be related to the ability to tolerate the secretion of digestive enzymes, bile salts, and acidic pH. Among them, genes for sugar metabolism and production of L-lactic acid were also present in the genome (Table 2).

Table 2. Genes possibly involved in acid and bile salt tolerance detected in the *L. fermentum* ATCC 23271 genome.

RAST/BLAST description	Query length	Accession length	Query cover	E value	Per ident	Accession
ATP synthase F0 sector subunit a / F0F1 ATP synthase subunit A	711 pb	236 aa	100%	7e -167	100%	WP_003682740.1
ATP synthase F0 sector subunit b / F0F1 ATP synthase subunit B	507 pb	168 aa	100%	6e -116	100%	WP_054173734.1
ATP synthase F0 sector subunit c / MULTISPECIES: F0F1 ATP synthase subunit C	213 pb	70 aa	100%	1e -38	100%	WP_003682741.1
ATP synthase alpha chain / F0F1 ATP synthase subunit alpha	1539 pb	512 aa	100%	0.0	99,80%	WP_086439482.1
ATP synthase beta chain / F0F1 ATP synthase subunit beta	1422 pb	473 aa	100%	0.0	99,79%	WP_057194567.1
ATP synthase delta chain / F0F1 ATP synthase subunit delta	546 pb	181 aa	100%	3e -126	99,45%	WP_057194565.1
ATP synthase gamma chain / F0F1 ATP synthase subunit gamma	936 pb	311 aa	100%	0.0	99,68%	WP_088460387.1
ATP synthase epsilon chain /	423 pb	140 aa	100%	3e -95	99,29%	WP_003685876.1
L-lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27) / L-lactate dehydrogenase	954 bp	317 aa	100%	0.0	99,68%	WP_012391154.1
L-lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27) / L-lactate dehydrogenase	942 bp	313 aa	100%	0.0	100%	WP_138464682.1
L-lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27) / L-lactate dehydrogenase	933 bp	310 aa	100%	0.0	100%	WP_046948611.1
PTS system, cellobiose-specific IIC component / PTS system oligo-beta-mannoside-specific EIIC component	1311 bp	436 aa	100%	0.0	100%	QIX58800.1
ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX / ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX	1251 bp	416 aa	100%	0.0	99,52%	WP_096493701.1
Glucose-6-phosphate isomerase (EC 5.3.1.9)/ glucose-6-phosphate isomerase	525 bp	174 aa	100%	1e -124	99,43%	RGW51862.1
Glucose-6-phosphate isomerase (EC 5.3.1.9)/ glucose-6-phosphate isomerase	1353 bp	450 aa	100%	0.0	99,56%	WP_021815746.1
GTP pyrophosphokinase (EC 2.7.6.5)/ GTP	612 bp	203 aa	100%	8e -	99,51%	WP_100184301.1

pyrophosphokinase				150			
Pyruvate kinase / pyruvate kinase	1422 bp	473 aa	100%	0.0	100%	WP_003684953.1	
Arginine/ornithine antiporter ArcD/ Amino acid transporter	1419 bp	472 aa	100%	0.0	100%	AOR74635.1	
Phosphoglycerate mutase/2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	678 bp	225 aa	100%	4e - 166	100%	WP_004562727.1	
Choloylglycine hydrolase/ choloylglycine hydrolase family protein	978 bp	325 aa	100%	0.0	100%	WP_035436617.1	
CTP synthase / CTP synthase	1602 bp	533 aa	100%	0.0	99,81%	WP_003684004.1	

Eight genes were related to proteins involved in bacterial ability to adhere to and colonize eukaryotic cells, thus, competing with pathogenic microorganisms for cell receptors, including: three related to the aggregation process; four related to the production of exopolysaccharides, and a fibronectin-binding domain-containing protein (Table 3).

Table 3. Proteins potentially involved in the adhesion and aggregation properties of *L. fermentum* ATCC 23271 strain.

RAST/BLAST description	Function	Query length	Accession length	Query cover	E value	Per ident	Accession
Aggregation substance precursor	Aggregation	1842 pb	613 aa	99%	0.0	99.84%	AKM50933.1
LysM peptidoglycan-binding domain-containing protein		591 pb	196 aa	99%	9,00E-85	100.00%	WP_021815732.1
LysM peptidoglycan-binding domain-containing protein		816 pb	315 aa	48%	1,00E-40	100.00%	WP_168183590.1
Exopolysaccharide biosynthesis polyprenyl glycosylphosphotransferase	Exopolysaccharide production	666 pb	229 aa	99%	3,00E-159	98.64%	WP_104877738.1
Exopolysaccharide biosynthesis protein		771 pb	256 aa	99%	0.0	99.22%	WP_163601282.1
CpsD/CapB family tyrosine-protein kinase		741 pb	247 aa	91%	3,00E-160	99.12%	WP_062813522.1
Exopolysaccharide biosynthesis protein		771 pb	256 aa	99%	5,00E-174	99.61%	KPH03198.1
Fibronectin-binding domain-containing protein	Adhesion	1692 pb	563 aa	99%	0.0	99.82%	WP_103205388.1

A search for genes related to the production of bacteriocins was performed using the BAGEL4 program. A sequence 48% similar to that of enterolysin A, a protein of *Enterococcus faecalis*, was obtained. Figure 8 shows the position of the bacteriocin sequence in green.

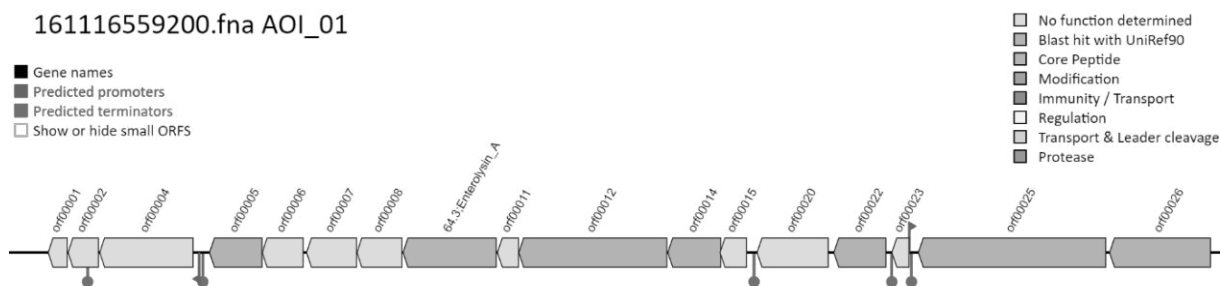


Figure 8. Prediction of a bacteriocin structure in the genome of *L. fermentum* ATCC 23271 strain.

After identifying the cleavage site of the translated bacteriocin protein sequence, using the SignalP 5.0 server, the mature protein was analyzed *in silico* to predict its antimicrobial activity by using four algorithms, including Support Vector Machine (SVM), Random Forest (RF), Artificial Neural Network (ANN) and, Discriminant Analysis (DA). Of these four algorithms, three indicated a high probability (>0.9) of the peptide to present antimicrobial activity (Table 4).

Table 4. Prediction of antimicrobial activity by using algorithms of CAMP_{R3} database.

Algorithms*	Results
SVM	1.000
DA	1.000
RF	0.957
ANN	NAMP

* Support Vector Machine, Discriminant Analysis, and Random Forest algorithms report the result as a probability score (0 to 1); the Artificial Neural Network algorithm provides the results as either AMP (antimicrobial) or NAMP (not-antimicrobial).

In the genomic assessment of strain safety, the searches performed in both the ResFinder and CARD databases did not identify any genes encoding acquired drug resistance. However, the *L. fermentum* ATCC 23271 genome possessed 19 genes related to intrinsic resistance to antibiotics and other toxic compounds, including heavy metals such as cobalt, mercury, cadmium, copper, and zinc; or represent potential targets for antimicrobial resistance, such as penicillin-binding protein, elongation factor G, DNA topoisomerase IV subunit B, topoisomerase IV subunit A, DNA topoisomerase (ATP-hydrolyzing) subunit B, and DNA gyrase subunit A (Table 5).

Table 5. Putative genes involved in resistance to antibiotics and toxic compounds.

RAST/BLAST description	Query length	Accession length	Query cover	E value	Per ident	Accession
Penicillin-binding protein	1017	338	99%	0.0	99.41%	EQC60084.1
Class A beta-lactamase-related serine hydrolase	1020	339	99%	0.0	99.12%	MBD9348952.1
Cation diffusion facilitator family transporter	906	301	99%	0.0	100.00%	WP_015639412.1
Elongation factor G	2085	694	99%	0.0	99.86%	KPH03387.1
DNA topoisomerase IV subunit B	1998	665	99%	0.0	99.85%	WP_003683141.1
Topoisomerase IV subunit A	2478	825	99%	0.0	100.00%	BAG27240.1
MerR family transcriptional regulator	423	140	99%	1e-97	100.00%	WP_003682036.1
Multidrug resistance protein MdtG	342	113	99%	2e-61	99.12%	QIX57855.1
MFS transporter	123	160	97%	2e-17	97.50%	WP_155762340.1
GTP-binding protein	1935	644	99%	0.0	100.00%	WP_112296957.1
Multidrug transporter	1227	413	99%	0.0	99.75%	AKM51464.1
DNA topoisomerase (ATP-hydrolyzing) subunit B	1950	649	99%	0.0	99.85%	WP_023465959.1
DNA gyrase subunit A	2511	836	99%	0.0	99.76%	WP_160229810.1
MerR family transcriptional regulator	423	151	99%	3e-98	100.00%	CDI69999.1
Multidrug transporter MatE	1317	438	99%	0.0	99.77%	WP_042513988.1
Heavy metal translocating P-type ATPase	1929	642	99%	0.0	99.84%	WP_112297009.1
MATE family efflux transporter	1320	439	99%	0.0	97.95%	WP_135252410.1
FAD-dependent oxidoreductase	1350	449	99%	0.0	100.00%	WP_100184414.1
Cation transporter	552	207	99%	4e-98	100.00%	WP_114684362.1

In addition, the strain was predicted to be a non-human pathogen by the PathogenFinder tool hosted by the Centre for Genomic Epidemiology. The probability of being a human pathogen was calculated as 0.202, indicating a low probability for *L. fermentum* ATCC 23271 to present pathogenicity, and the estimated matched pathogenic families were 0. There was no hit for virulence determinants using the VirulenceFinder tool, also hosted by the Centre for Genomic Epidemiology. Two prophage regions were identified within the entire genome, and analysis using the PHASTER tool revealed that the sequences were incomplete. A search for the CRISPR-Cas sequence found two CDS putative sequences for the CRISPR sequences with the associated *cas* gene. These fragments occurred on contig identity NZ_JAHBRU010000076.1_1 (in the region between 17,626 and 18,783 bp) and NZ_JAHBRU010000115.1_1 (in the region between 850 and 3317 bp). The first identified CRISPR sequence contained 17 spacer genes and a 36 bp repeat consensus (GTCTTGGATGAGTGTCAGATCAGTAGTTCCGAGTAC), and the latter contained 40 spacer genes and a 28 bp repeat consensus (GGATCACCCCATATACATGGGGAGCAC).

In addition, other putative genes were found in the genome of *L. fermentum* ATCC 23271 with important features including the following: i) glutathione biosynthesis bifunctional protein (GshAB) and bifunctional glutamate-

cysteine ligase/glutathione synthetase, which are involved in the biosynthesis of glutathione; ii) peptide methionine sulfoxide reductases (MsrA and MsrB); iii) free methionine-(R)-sulfoxide reductase; iv) NADH peroxidase, and v) thiol peroxidase; these are involved in the bacterial protection against oxidative stress [54-57].

3.3 Antagonism activity

To confirm the inhibitory activity of the ATCC 23271 strain against *Candida* spp. and its low activity against bacteria [37], the overlay method was used as an antagonism assay. *L. fermentum* ATCC 23271 impaired the growth of *Candida* spp. with inhibition zones ranging from $13,5 \pm 2,1$ mm to $26,5 \pm 2,1$ mm. The only exceptions were two *Candida krusei* strains (ATCC 6258 and GJFD), which were not inhibited by the probiotic. Regarding the assays with bacterial strains, inhibition was observed only in the area immediately above the growth of the ATCC 23271 strain, that is, without the formation of large inhibition zones (Table 6).

Table 6. Antagonism assay by the overlay method against *L. fermentum* ATCC 23271

Pathogen	Inhibition zone in mm \pm SD*
<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)	<i>In situ</i>
<i>E. coli</i> enteroaggregative 17.2	<i>In situ</i>
<i>Salmonella enterica</i> (ATCC 13076)	<i>In situ</i>
<i>C. albicans</i> (ATCC 90028)	$17 \pm 1,41$
<i>C. albicans</i> (SC 5314)	$16,5 \pm 1,12$
<i>C. albicans</i> 44	$14 \pm 1,4$
<i>C. albicans</i> CAS	20 ± 0
<i>C. krusei</i> (ATCC 6258)	–
<i>C. krusei</i> GJFD	–
<i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 22019)	$26,5 \pm 2,1$
<i>C. parapsilosis</i> FSG	$13,5 \pm 2,1$
<i>C. parapsilosis</i> RCL	$14,5 \pm 0,7$

**In situ* inhibition occurred just above *L. fermentum* ATCC 23271 growth; – no inhibition.

3.4 Interference in pathogen cell adhesion

Due to the reduced inhibitory activity of *L. fermentum* on bacterial pathogens, interference assays on adhesion to HeLa cells were performed only with *Candida* strains. In the competition assay, three clinical strains (*C. albicans* CAS, *C. krusei* GJFD, and *C. parapsilosis* RCL) had their adherence to eukaryotic cells completely inhibited by *L. fermentum* ATCC 23271, an effect also noted for the reference strain *C. parapsilosis* ATCC 22019 (Figure 9A). In the exclusion experiment, on one hand, *L. fermentum* ATCC 23271 decreased the adhesion of *C. albicans* ATCC 90028, *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019, and *C. parapsilosis*

FSG to HeLa cells. On the other hand, *C. krusei* GJFD and *C. albicans* SC 5314 adhered more in the presence of *L. fermentum* ATCC 23271 (Figure 9B). In the displacement assay, *C. albicans* CAS, *C. krusei* GJFD, *C. krusei* ATCC 6258, and *C. parapsilosis* ATCC 22019 showed reduced adhesion to eukaryotic cells (Figure 9C).

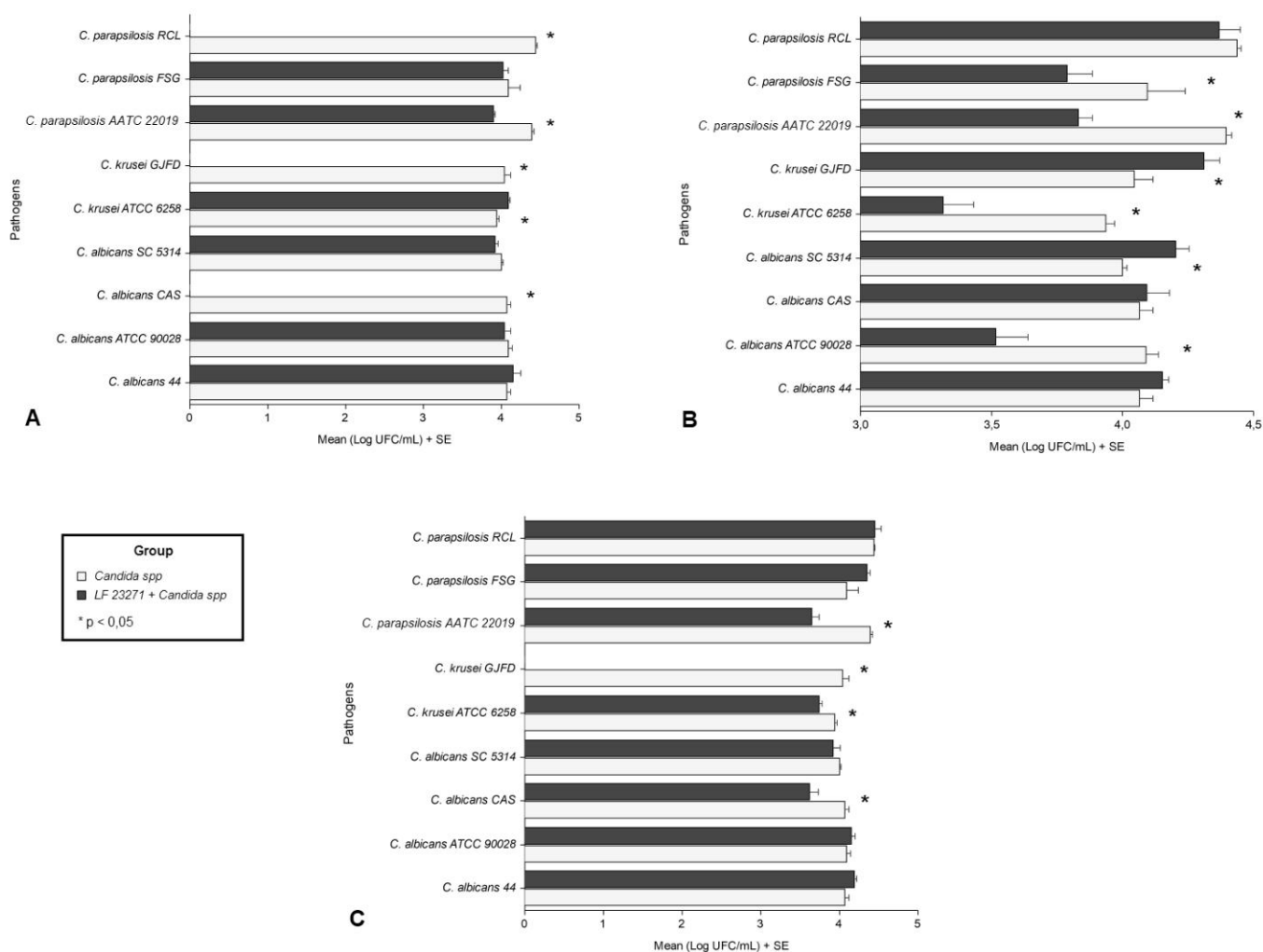


Figure 9. Inhibition of adhesion of *Candida* strains to eukaryotic cells by *L. fermentum* ATCC 23271 in three experiments: (A) competition, (B) exclusion and (C) displacement. * Represents the strains that had their adhesion to eukaryotic cells significantly influenced by *L. fermentum* ATCC 23271.

3.5 Tolerance to bile salts and acidic pH

To assess *L. fermentum* ATCC 23271 resistance to adverse host conditions, the bacterium was incubated in the presence of bile salts and acidic pH. The microorganism

demonstrated a higher tolerance when cultivated at pH 4.0; however, it still had a survival rate greater than 60% when in a more acidic pH (pH 2.0). Exposure to bile salts did not affect *L. fermentum* growth. On the contrary, the highest survival rate was found following incubation with 0.5% bile salts (Table 7).

Table 7. *L. fermentum* ATCC 23271 survival rate in the presence of acidic pH and bile salts.

Conditions	% of <i>L. fermentum</i> survival (\pm SD) ¹	<i>p</i> value ²
pH 2.0	60,88 \pm 0,9569	0,0043
pH 4.0	105,0 \pm 5,909	
Bile salt 0,5%	109,7 \pm 4,434	0,0348
Bile salt 1%	94,13 \pm 1,244	

¹ Data represent the survival percentage of *L. fermentum* ATCC 23271 after 180 min of exposure to different conditions compared to growth under normal conditions. ²Statistical analysis was performed by Student's t-test ($p < 0.05$).

3.6 Antibiotic susceptibility assay

Antibiotic susceptibility was assessed by the disc diffusion method. *L. fermentum* ATCC 23271 was susceptible to most of the tested antibiotics. *L. fermentum* ATCC 23271 also exhibited moderate susceptibility to cefoxitin and norfloxacin, and resistance to gentamycin, trimethoprim/sulfamethoxazole, and vancomycin (Table 8).

Table 8. *L. fermentum* ATCC 23271 antimicrobial susceptibility by the disc diffusion method.

Antibiotics	<i>L. fermentum</i> ATCC 23271		
	Zone inhibition in mm	Interpretation*	
Cefazolin	22	Susceptible	
Chloramphenicol	34		
Ciprofloxacin	21		
Clindamycin	31		
Erythromycin	39		
Linezolid	40		
Nitrofurantoin	30		
Rifampicin	34		
Penicillin G	41		
Tetracycline	38		
Tigecillin	40		
Cefoxitin	15		Moderately susceptible
Norfloxacin	14		
Gentamycin	12		Resistant
Sulfazotrim	0		
Vancomycin	0		

* Based on the criteria for the diameters of inhibition zones described by Charteris et al. [53]

4. Discussion

This study presents for the first time, a genomic analysis of *L. fermentum* ATCC 23271 in regards of important characteristics which confer a strain, a probiotic profile. In addition to its *in vitro* anti-*Candida* activity, different *in silico* functional analyses have revealed several protein-coding sequences associated with other probiotic properties of *L. fermentum* ATCC 23271, as well as with its safety for human use.

The *L. fermentum* ATCC 23271 strain was subjected to comparative analysis using the OrthoVenn program with others of the same species, which have previously reported beneficial effects. In this context, *L. fermentum* CECT 5716 strain has been extensively studied and its probiotic properties include: modulation of the host immune response [58], enhanced response to influenza vaccination in adults [59], reduction of *Staphylococcus* load in breast milk of lactating mothers [60], and reduced incidence of respiratory and gastrointestinal infections in infants [32]. The DR 9 strain has demonstrated antioxidant effects (*via* upregulation of oxoprolin) and immunomodulatory effects in aging rats [61, 62]; it also prevents telomere shortening in aging rats [63]. The *L. fermentum* 3872 strain is known for its potential for combating *Campylobacter jejuni* infections [30]. This strain also has a unique collagen binding protein encoded by the *cbp* gene with five repetitive 'B domains' (whereas the other *L. fermentum* strains only have four "B domains") [64]. *L. fermentum* AGR1485 strain has the capacity to increase transepithelial electrical resistance (TEER) across Caco-2 cell layers, thus, enhancing barrier integrity and protecting against infections by enteropathogens [65]. *L. fermentum* MCC 2760 has displayed several activities, including cholesterol reduction, high antioxidant potential, as well as anti-inflammatory actions [27, 66]. Since *L. fermentum* ATCC 23271 shares 941 gene clusters with all those strains, it is possible that it also shares some of their probiotic properties.

Phylogenetic analysis showed that *L. fermentum* ATCC 23271 is part of the clade along with other strains of the same species, including *L. cellobiosus* DSM 20055. *L. cellobiosus* was first described by Rogosa et al. [67] and as *L. fermentum*, is another heterofermentative *Lactobacillus* species. Both species share very similar phenotypic properties, and both belong to the subgenus 'Betabacterium' Orla-Jensen of *Lactobacillus* [68]. These authors support the idea that *L. cellobiosus* and *L. fermentum* should be united under the same name, with *L. fermentum* being the earlier synonym [68].

Previous studies have indicated a close relationship between *L. cellobiosus* and *Limosilactobacillus fermentum*; in fact, *L. cellobiosus* has now been reclassified as a biovar of *L. fermentum* [26]. The external lineage is *L. gorillae* KZ01, which is phylogenetically related to human-associated *L. fermentum*; however, it has not been found in humans yet and has been isolated from the feces of a captive western lowland gorilla (*Gorilla gorilla*) [69].

Concerning the tolerance to adverse conditions, the genome analysis showed that *L. fermentum* ATCC 23271 have several genes encoding proteins which are responsible for the resistance to acidic pH and bile salts. ATP synthases are some of the proteins involved mainly in acid tolerance, as they are associated with pH cytoplasmic regulation by ATP hydrolysis, which maintains pH homeostasis and protects cells from the damage induced by an acidic environment [70]. Glucose-6-phosphate isomerase is also involved in acid tolerance, acting as an acid shock protein [70]. All of these genes and others encoding proteins that promote acid and bile tolerance were detected in the genome of *L. fermentum* ATCC 23271 [71]. Phenotypic analysis also demonstrated its ability to survive in the presence of acidic pH and bile salts, corroborating its genetic background. In addition, *L. fermentum* ATCC 23271 contains putative genes encoding antioxidant enzymes, such as glutathione biosynthesis bifunctional protein, bifunctional glutamate-cysteine ligase, glutathione synthetase, peptide methionine sulfoxide reductases, free methionine-(R)-sulfoxide reductase, NADH peroxidase, and thiol peroxidase. These enzymes (or their products) can protect cells against oxidative damage caused by reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen species [55, 72, 73].

Additionally, other evidence shows that the enzyme methionine sulfoxide reductase (Msr) may also be involved in bacterial adhesion [74]. *L. fermentum* ATCC23271 has two types of this enzyme (MsrA and MsrB). In this regard, the ability to adhere to host tissues is an important attribute of probiotics [10]. *L. fermentum* ATCC 23271 presented nine genes encoding adhesion-related proteins, including exopolysaccharides (EPSs), which have different effects on probiotic adhesion to intestinal mucus, according to their different physicochemical and/or structural characteristics [75]. In addition, the gene that encodes the fibronectin-binding protein has also been found, and it is known to facilitate adhesion to the extracellular matrix of mammalian

cells [76]. Both mechanisms could enable *L. fermentum* ATCC 23271 to adhere to host tissues and colonize the environment.

Competition for adhesion sites is an additional strategy used by probiotics to inhibit colonization by pathogens. In the present study, a strong ability to inhibit adhesion of some *Candida* strains to eukaryotic cells was observed (mainly genital clinical isolates) in the competition and displacement assays. Heinemann et al. [77] showed that *L. fermentum* RC-14 is capable of releasing an active surface component, which can inhibit the adhesion of uropathogenic bacteria. In the same study, it was possible to purify a protein with anti-adhesive capacity against *Enterococcus faecalis* 1131. Another study showed that *L. fermentum* isolated from humans inhibit the adhesion of enteropathogens, such as that of *E. coli* to host cells, through a SAP protein [78]. The fact that some pathogens present greater adhesion in the presence of *L. fermentum* ATCC 23271 may be related to the production of aggregation proteins or EPS, as previously suggested [75, 79, 80].

Bacteriocins are small peptides secreted by many gram-positive bacteria, with significant activity against distinct microorganisms [81]. A recent study demonstrated that SD11, a *L. fermentum*-derived bacteriocin, possesses anti-*Candida* activity [82]. Herein, genomic analysis of *L. fermentum* ATCC 23271 by the BAGEL 4 program showed the presence of a gene encoding a hypothetical protein with low similarity (48%) to enterolysin A. Interestingly, this bacteriocin is known to be produced by *Enterococcus faecalis* LMG 2333 and to inhibit some species of *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, and *Pediococcus* [83]. We also demonstrated that three algorithms indicated a high probability of this protein having antimicrobial activity. The evidence allows us to suggest that the antifungal activity observed in our study may be due to bacteriocins. However, further studies are necessary to determine the exact bacteriocins or any additional proteins involved in this activity.

Resistance to antibiotics is a concern because of the possibility of transferring the plasmid containing these genes to other pathogenic bacteria, make infections difficult to treat. The European Food Safety Authority (EFSA) recommends that bacterial strains harboring transferable antibiotic resistance genes should not be used as probiotics

in animal feeds, fermented foods, and foods for human consumption [84]. Lactobacilli are susceptible to all protein synthesis inhibitors except aminoglycosides, but are generally intrinsically resistant to quinolones, trimethoprim, and sulphonamides, and, in the case of *L. fermentum*, also to glycopeptides [85]. All antibiotics to which *L. fermentum* ATCC 23271 showed resistance or moderate susceptibility indicate an intrinsic rather transferable resistance capacity.

L. fermentum ATCC 23271 presented two regions of prophages found in the genome characterized as incomplete, indicating that they were not functional. The identified transposases and other insertion sequences did not flank the resistance genes, further limiting their transferability. Furthermore, genome analysis revealed two regularly intercalated short palindromic repeat sequences (CRISPR) with the Cas gene and associated spacers. It has been reported that the presence of a CRISPR region may limit the spread of antimicrobial-resistant genes by inhibiting gene transfer pathways [86]. The CRISPR-Cas fragments work as line of defense for the host strain against the insertion of extrachromosomal DNA molecules [50, 86]. Therefore, their presence in the strain ATCC 23271 suggests a reduced probability of acquiring antimicrobial-resistant genes.

The protective role of *Lactobacillus* spp. against *Candida* spp. has been controversial, as the microorganism can be observed in high amounts in patients with *Candida* vaginitis [87]. In addition, many women with candidiasis may not have an altered microbiota [88]. These differences may be due to several factors including those inherent to the patient (such as age, immune status, and symptoms) and factors related to the virulence properties of the *Candida* species causing the infection [89]. On the other hand, it has already been clearly demonstrated that a diversity of *Lactobacillus* spp. has antifungal effects [90-92]. Furthermore, only some strains of *Lactobacillus* can produce antimicrobial compounds in the amounts necessary for an antifungal activity, which possibly explains the failure of some vaginal lactobacilli to suppress colonization by *Candida*. In this context, our data indicates that *L. fermentum* ATCC 23271 may represent a potential strategy to prevent *Candida* colonization.

Genome sequence analysis can contribute to the understanding of the molecular basis of the probiotic

functions of *L. fermentum* ATCC 23271. However, the genetic basis for growth and adhesion inhibitory activities against *Candida* need to be validated. Thus, gene knockout mutants of this strain are now being constructed to better assess the roles of the putative antimicrobial peptide and adhesin genes in these activities. The most notable feature is the number of genes associated with strain adhesion and survival under unfavorable conditions such as acidic pH, bile salts, or even oxidative environments. Other interesting genomic components that represent some of the features that contribute to probiotic activity include many genes involved in sugar transport and metabolism, including oligosaccharides. One element that is part of the general characteristics of a probiotic is its safety for human use, which is assured by the absence of acquired antibiotic resistance and virulence genes, and the presence of gene loci associated with CRISPR/CRISPR (cas) and incomplete prophage regions.

5. Conclusions

The data from the present study demonstrates that *L. fermentum* ATCC 23271 is a probiotic candidate with anti-*Candida* activity. It can inhibit the growth of *C. albicans* and *C. parapsilosis*, in addition to being able to interfere with the adhesion of *Candida* spp. to host cells. Genomic analyses showed a variety of genes possibly associated with strain adhesion to host cells and molecules, tolerance to acidic pH, bile salts, and oxidative stress as well as safety for human consumption. A limitation of the study is that the mechanism of growth inhibition of different *Candida* species is yet to be completely established. Although we have identified a probable protein with antifungal activity, we still need to validate this finding through studies with mutants, with synthetic peptides (whose sequences are derived from this protein), and also in animal experiments. An important aspect revealed by the comparative genomic analysis is that the strain shares many genes with other strains of the same species that have different probiotic properties. Nonetheless, our findings indicate a promising use of *L. fermentum* ATCC 23271 as an anti-*Candida* therapy.

Author Contributions: Conceptualization, C.I.S., A.S.M., and V.M.-N.; methodology, C.I.S., C.D.L., M.S.C., F.A.B.N, E.P.S.C., L.F.G., C.R.A.V.M., and V.M.-N.; validation, W.R.N.-N., J.M.M., J.M.M.A., F.S.P, and I.S.S.F.; formal analysis, C.I.S., C.R.A.V.M., F.S.P, I.S.S.F., R.A.H., S.G.M., E.S.F, A.S.M., and V.M.-N.; investigation, C.I.S., C.D.L., M.S.C., F.A.B.N, E.P.S.C., L.F.G., and V.M.-N.; data curation, W.R.N.-N., R.M.F., J.M.M., J.M.M.A. and V.M.-N.; writing—original draft preparation, C.I.S.; writing—review and editing, F.S.P, I.S.S.F.,

E.S.F, A.S.M., and V.M.-N.; visualization, C.I.S., C.R.A.V.M., R.A.H., and S.G.M.; supervision, V.M.-N.; project administration, C.I.S. and V.M.-N.; funding acquisition, S.G.M., E.S.F, and V.M.-N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) - Finance Code 001 to E.S.F. and V.M.-N.; Fundação de Amparo à Pesquisa e o Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA), Universal No.00995/17 to V.M.-N.; and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) grant No. 305676/2019-9 to E.S.F., No. 315348/2020-8 to S.G.M., and No. 315072/2020-2 to V.M.-N.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Sequence data used in this study were deposited at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) as part of the BioProject PRJNA729474. Raw reads were deposited in the Sequence Read Archive (SRA) under the accession number SRX10856814. Whole Genome Shotgun assemblies have been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the accession number JAHBRU0000000001.

Acknowledgments: The authors would like to thank Hélio Euclides S. dos Santos for technical assistance and to Editage (www.editage.com) for English language editing.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Achkar, J. M.; Fries, B. C., Candida infections of the genitourinary tract. *Clin Microbiol Rev* **2010**, *23*, (2), 253-73, doi:10.1128/CMR.00076-09.
2. Millsop, J. W.; Fazel, N., Oral candidiasis. *Clin Dermatol* **2016**, *34*, (4), 487-94, doi:10.1016/j.clindermatol.2016.02.022.
3. Sobel, J. D., Vaginitis. *N Engl J Med* **1997**, *337*, (26), 1896-903, doi:10.1056/NEJM199712253372607.
4. Pappas, P. G.; Kauffman, C. A.; Andes, D. R.; Clancy, C. J.; Marr, K. A.; Ostrosky-Zeichner, L.; Reboli, A. C.; Schuster, M. G.; Vazquez, J. A.; Walsh, T. J.; Zaoutis, T. E.; Sobel, J. D., Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* **2016**, *62*, (4), e1-50, doi:10.1093/cid/civ933.
5. Owen, M. K.; Clenney, T. L., Management of vaginitis. *Am Fam Physician* **2004**, *70*, (11), 2125-32, doi:
6. Mroczynska, M.; Brillowska-Dabrowska, A., Review on Current Status of Echinocandins Use. *Antibiotics (Basel)* **2020**, *9*, (5), doi:10.3390/antibiotics9050227.
7. Sobel, J. D.; Sobel, R., Current treatment options for vulvovaginal candidiasis caused by azole-resistant *Candida* species. *Expert Opin Pharmacother* **2018**, *19*, (9), 971-977, doi:10.1080/14656566.2018.1476490.
8. Hill, C.; Guarner, F.; Reid, G.; Gibson, G. R.; Merenstein, D. J.; Pot, B.; Morelli, L.; Canani, R. B.; Flint, H. J.; Salminen, S.; Calder, P. C.; Sanders, M. E., Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2014**, *11*, (8), 506-14, doi:10.1038/nrgastro.2014.66.
9. Kerry, R. G.; Patra, J. K.; Gouda, S.; Park, Y.; Shin, H.-S.; Das, G., Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of food and drug analysis* **2018**, *26*, (3), 927-939, doi:10.1016/j.jfda.2018.01.002.

10. do Carmo, M. S.; Santos, C. I. D.; Araujo, M. C.; Giron, J. A.; Fernandes, E. S.; Monteiro-Neto, V., Probiotics, mechanisms of action, and clinical perspectives for diarrhea management in children. *Food Funct* **2018**, *9*, (10), 5074-5095, doi:10.1039/c8fo00376a.
11. Johnston, B. C.; Ma, S. S.; Goldenberg, J. Z.; Thorlund, K.; Vandvik, P. O.; Loeb, M.; Guyatt, G. H., Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* **2012**, *157*, (12), 878-88, doi:10.7326/0003-4819-157-12-201212180-00563.
12. Feyisetan, O.; Tracey, C.; Hellawell, G. O., Probiotics, dendritic cells and bladder cancer. *BJU Int* **2012**, *109*, (11), 1594-7, doi:10.1111/j.1464-410X.2011.10749.x.
13. Hendler, R.; Zhang, Y., Probiotics in the Treatment of Colorectal Cancer. *Medicines (Basel)* **2018**, *5*, (3), 101, doi:10.3390/medicines5030101.
14. Mendoza, L., Potential effect of probiotics in the treatment of breast cancer. *Oncol Rev* **2019**, *13*, (2), 422, doi:10.4081/oncol.2019.422.
15. Hemarajata, P.; Versalovic, J., Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therap Adv Gastroenterol* **2013**, *6*, (1), 39-51, doi:10.1177/1756283X12459294.
16. Zimmermann, P.; Curtis, N., The influence of probiotics on vaccine responses - A systematic review. *Vaccine* **2018**, *36*, (2), 207-213, doi:10.1016/j.vaccine.2017.08.069.
17. Goderska, K.; Agudo Pena, S.; Alarcon, T., *Helicobacter pylori* treatment: antibiotics or probiotics. *Appl Microbiol Biotechnol* **2018**, *102*, (1), 1-7, doi:10.1007/s00253-017-8535-7.
18. Moayyedi, P.; Ford, A. C.; Talley, N. J.; Cremonini, F.; Foxx-Orenstein, A. E.; Brandt, L. J.; Quigley, E. M., The efficacy of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. *Gut* **2010**, *59*, (3), 325-32, doi:10.1136/gut.2008.167270.
19. Fiocchi, A.; Pawankar, R.; Cuello-Garcia, C.; Ahn, K.; Al-Hammadi, S.; Agarwal, A.; Beyer, K.; Burks, W.; Canonica, G. W.; Ebisawa, M.; Gandhi, S.; Kamenwa, R.; Lee, B. W.; Li, H.; Prescott, S.; Riva, J. J.; Rosenwasser, L.; Sampson, H.; Spigler, M.; Terracciano, L.; Vereda-Ortiz, A.; Waserman, S.; Yepes-Nunez, J. J.; Brozek, J. L.; Schunemann, H. J., World Allergy Organization-McMaster University Guidelines for Allergic Disease Prevention (GLAD-P): Probiotics. *World Allergy Organ J* **2015**, *8*, (1), 4, doi:10.1186/s40413-015-0055-2.
20. Sargin, P.; Cieccko, A. E.; Dew, K.; Rhonda, G.; Jia, S.; Laib, T.; Roethle, M. F.; Hessner, M. J., Probiotic Supplementation with *Lactobacillus plantarum* 299v Lowers Systemic Inflammation, Reduces Islet ER Stress and Prevents Type 1 Diabetes in BioBreeding Rats. *Journal of the Endocrine Society* **2021**, *5*, (Supplement_1), A661-A662, doi:10.1210/jendso/bvab048.1350.
21. Roselli, M.; Pieper, R.; Rogel-Gaillard, C.; de Vries, H.; Bailey, M.; Smidt, H.; Lauridsen, C., Immunomodulating effects of probiotics for microbiota modulation, gut health and disease resistance in pigs. *Animal Feed Science and Technology* **2017**, *233*, 104-119, doi:10.1016/j.anifeedsci.2017.07.011.
22. Rocha-Ramirez, L. M.; Perez-Solano, R. A.; Castanon-Alonso, S. L.; Moreno Guerrero, S. S.; Ramirez Pacheco, A.; Garcia Garibay, M.; Eslava, C., Probiotic *Lactobacillus* Strains Stimulate the Inflammatory Response and Activate Human Macrophages. *J Immunol Res* **2017**, *2017*, 4607491, doi:10.1155/2017/4607491.
23. Vitetta, L.; Saltzman, E. T.; Thomsen, M.; Nikov, T.; Hall, S., Adjuvant Probiotics and the Intestinal Microbiome: Enhancing Vaccines and Immunotherapy Outcomes. *Vaccines (Basel)* **2017**, *5*, (4), 50, doi:10.3390/vaccines5040050.
24. Hempel, S.; Newberry, S.; Ruelaz, A.; Wang, Z.; Miles, J.; Suttorp, M. J.; Johnsen, B.; Shanman, R.; Slusser, W.; Fu, N., Safety of probiotics used to reduce risk and prevent or treat disease. *Evidence report/technology assessment* **2011**, (200), 1-645, doi:
25. Lee, Y. K., Probiotics microorganisms. In *Handbook of Probiotics and Prebiotics*, 2nd ed.; LEE, Y. K.; Salminen, S., Eds. John Wiley & Sons: New Jersey, 2009; pp 3-24.
26. Zheng, J.; Wittouck, S.; Salvetti, E.; Franz, C.; Harris, H. M. B.; Mattarelli, P.; O'Toole, P. W.; Pot, B.; Vandamme, P.; Walter, J.; Watanabe, K.; Wuyts, S.; Felis, G. E.; Ganzle, M. G.; Lebeer, S., A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended

- description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *Int J Syst Evol Microbiol* **2020**, *70*, (4), 2782-2858, doi:10.1099/ijsem.0.004107.
27. Archer, A. C.; Halami, P. M., Probiotic attributes of *Lactobacillus fermentum* isolated from human feces and dairy products. *Appl Microbiol Biotechnol* **2015**, *99*, (19), 8113-23, doi:10.1007/s00253-015-6679-x.
 28. Cox, A. J.; Pyne, D. B.; Saunders, P. U.; Fricker, P. A., Oral administration of the probiotic *Lactobacillus fermentum* VRI-003 and mucosal immunity in endurance athletes. *Br J Sports Med* **2010**, *44*, (4), 222-6, doi:10.1136/bjsm.2007.044628.
 29. Falah, F.; Vasiee, A.; Behbahani, B. A.; Yazdi, F. T.; Moradi, S.; Mortazavi, S. A.; Roshanak, S., Evaluation of adherence and anti-infective properties of probiotic *Lactobacillus fermentum* strain 4-17 against *Escherichia coli* causing urinary tract infection in humans. *Microb Pathog* **2019**, *131*, 246-253, doi:10.1016/j.micpath.2019.04.006.
 30. Lehri, B.; Seddon, A.; Karlyshev, A., *Lactobacillus fermentum* 3872 as a potential tool for combatting *Campylobacter jejuni* infections. *Virulence* **2017**, *8*, (8), 1753-1760, doi:10.1080/21505594.2017.1362533.
 31. Lin, W. H.; Yu, B.; Jang, S. H.; Tsen, H. Y., Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. *Anaerobe* **2007**, *13*, (3-4), 107-13, doi:10.1016/j.anaerobe.2007.04.006.
 32. Maldonado, J.; Canabate, F.; Sempere, L.; Vela, F.; Sanchez, A. R.; Narbona, E.; Lopez-Huertas, E.; Geerlings, A.; Valero, A. D.; Olivares, M.; Lara-Villoslada, F., Human milk probiotic *Lactobacillus fermentum* CECT5716 reduces the incidence of gastrointestinal and upper respiratory tract infections in infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **2012**, *54*, (1), 55-61, doi:10.1097/MPG.0b013e3182333f18.
 33. Mikelsaar, M.; Zilmer, M., *Lactobacillus fermentum* ME-3—an antimicrobial and antioxidative probiotic. *Microbial ecology in health and disease* **2009**, *21*, (1), 1-27, doi:10.1080/08910600902815561.
 34. Ramos, C. L.; Thorsen, L.; Schwan, R. F.; Jespersen, L., Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products. *Food Microbiol* **2013**, *36*, (1), 22-9, doi:10.1016/j.fm.2013.03.010.
 35. Pereira, D. I.; McCartney, A. L.; Gibson, G. R., An in vitro study of the probiotic potential of a bile-salt-hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* strain, and determination of its cholesterol-lowering properties. *Appl Environ Microbiol* **2003**, *69*, (8), 4743-52, doi:10.1128/AEM.69.8.4743-4752.2003.
 36. Zhao, Y.; Hong, K.; Zhao, J.; Zhang, H.; Zhai, Q.; Chen, W., *Lactobacillus fermentum* and its potential immunomodulatory properties. *Journal of functional foods* **2019**, *56*, 21-32, doi:10.1016/j.jff.2019.02.044.
 37. do Carmo, M. S.; Noronha, F. M.; Arruda, M. O.; Costa, E. P.; Bomfim, M. R.; Monteiro, A. S.; Ferro, T. A.; Fernandes, E. S.; Giron, J. A.; Monteiro-Neto, V., *Lactobacillus fermentum* ATCC 23271 Displays In vitro Inhibitory Activities against *Candida* spp. *Front Microbiol* **2016**, *7*, 1722, doi:10.3389/fmicb.2016.01722.
 38. Coil, D.; Jospin, G.; Darling, A. E., A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data. *Bioinformatics* **2015**, *31*, (4), 587-9, doi:10.1093/bioinformatics/btu661.
 39. Huang, X.; Madan, A., CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res* **1999**, *9*, (9), 868-77, doi:10.1101/gr.9.9.868.
 40. Seemann, T., Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* **2014**, *30*, (14), 2068-9, doi:10.1093/bioinformatics/btu153.
 41. Wang, Y.; Coleman-Derr, D.; Chen, G.; Gu, Y. Q., OrthoVenn: a web server for genome wide comparison and annotation of orthologous clusters across multiple species. *Nucleic Acids Res* **2015**, *43*, (W1), W78-84, doi:10.1093/nar/gkv487.
 42. Almagro Armenteros, J. J.; Tsirigos, K. D.; Sonderby, C. K.; Petersen, T. N.; Winther, O.; Brunak, S.; von Heijne, G.; Nielsen, H., SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nat Biotechnol* **2019**, *37*, (4), 420-423, doi:10.1038/s41587-019-0036-z.

43. Meier-Kolthoff, J. P.; Göker, M., TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nature communications* **2019**, *10*, (1), 1-10, doi:10.1038/s41467-019-10210-3.
44. Darling, A. E.; Mau, B.; Perna, N. T., progressiveMauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PLoS One* **2010**, *5*, (6), e11147, doi:10.1371/journal.pone.0011147.
45. Cosentino, S.; Voldby Larsen, M.; Møller Aarestrup, F.; Lund, O., PathogenFinder-distinguishing friend from foe using bacterial whole genome sequence data. *PloS one* **2013**, *8*, (10), e77302, doi:10.1371/journal.pone.0077302.
46. Zankari, E.; Hasman, H.; Cosentino, S.; Vestergaard, M.; Rasmussen, S.; Lund, O.; Aarestrup, F. M.; Larsen, M. V., Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother* **2012**, *67*, (11), 2640-4, doi:10.1093/jac/dks261.
47. Alcock, B. P.; Raphenya, A. R.; Lau, T. T. Y.; Tsang, K. K.; Bouchard, M.; Edalatmand, A.; Huynh, W.; Nguyen, A. V.; Cheng, A. A.; Liu, S.; Min, S. Y.; Miroshnichenko, A.; Tran, H. K.; Werfalli, R. E.; Nasir, J. A.; Oloni, M.; Speicher, D. J.; Florescu, A.; Singh, B.; Faltyn, M.; Hernandez-Koutoucheva, A.; Sharma, A. N.; Bordeleau, E.; Pawlowski, A. C.; Zubyk, H. L.; Dooley, D.; Griffiths, E.; Maguire, F.; Winsor, G. L.; Beiko, R. G.; Brinkman, F. S. L.; Hsiao, W. W. L.; Domselaar, G. V.; McArthur, A. G., CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res* **2020**, *48*, (D1), D517-D525, doi:10.1093/nar/gkz935.
48. Joensen, K. G.; Scheutz, F.; Lund, O.; Hasman, H.; Kaas, R. S.; Nielsen, E. M.; Aarestrup, F. M., Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* **2014**, *52*, (5), 1501-10, doi:10.1128/JCM.03617-13.
49. Arndt, D.; Grant, J. R.; Marcu, A.; Sajed, T.; Pon, A.; Liang, Y.; Wishart, D. S., PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res* **2016**, *44*, (W1), W16-21, doi:10.1093/nar/gkw387.
50. Grissa, I.; Vergnaud, G.; Pourcel, C., CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Res* **2007**, *35*, (Web Server issue), W52-7, doi:10.1093/nar/gkm360.
51. Kaewnopparat, S.; Dangmanee, N.; Kaewnopparat, N.; Srichana, T.; Chulasiri, M.; Settharaksa, S., In vitro probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* SK5 isolated from vagina of a healthy woman. *Anaerobe* **2013**, *22*, 6-13, doi:10.1016/j.anaerobe.2013.04.009.
52. Monteiro, C.; do Carmo, M. S.; Melo, B. O.; Alves, M. S.; Dos Santos, C. I.; Monteiro, S. G.; Bomfim, M. R. Q.; Fernandes, E. S.; Monteiro-Neto, V., In Vitro Antimicrobial Activity and Probiotic Potential of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* against Species of *Clostridium*. *Nutrients* **2019**, *11*, (2), doi:10.3390/nu11020448.
53. Charteris, W. P.; Kelly, P. M.; Morelli, L.; Collins, J. K., Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J Food Prot* **1998**, *61*, (12), 1636-43, doi:10.4315/0362-028x-61.12.1636.
54. Al-Madboly, L. A.; Khedr, E. G.; Ali, S. M., Optimization of Reduced Glutathione Production by a *Lactobacillus plantarum* Isolate Using Plackett-Burman and Box-Behnken Designs. *Front Microbiol* **2017**, *8*, 772, doi:10.3389/fmicb.2017.00772.
55. Ianniello, R. G.; Zheng, J.; Zotta, T.; Ricciardi, A.; Ganzle, M. G., Biochemical analysis of respiratory metabolism in the heterofermentative *Lactobacillus spicheri* and *Lactobacillus reuteri*. *J Appl Microbiol* **2015**, *119*, (3), 763-75, doi:10.1111/jam.12853.
56. Walter, J.; Heng, N. C.; Hammes, W. P.; Loach, D. M.; Tannock, G. W.; Hertel, C., Identification of *Lactobacillus reuteri* genes specifically induced in the mouse gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* **2003**, *69*, (4), 2044-51, doi:10.1128/AEM.69.4.2044-2051.2003.
57. Zhang, W.; Ji, H.; Zhang, D.; Liu, H.; Wang, S.; Wang, J.; Wang, Y., Complete Genome Sequencing of *Lactobacillus plantarum* ZLP001, a Potential Probiotic That Enhances Intestinal Epithelial Barrier Function and Defense Against Pathogens in Pigs. *Front Physiol* **2018**, *9*, 1689, doi:10.3389/fphys.2018.01689.

58. Martínez-Abad, B.; Garrote, J. A.; Bernardo, D.; Montalvillo, E.; Escudero-Hernández, C.; Vázquez, E.; Rueda, R.; Arranz, E., Differential immunomodulatory effects of *Lactobacillus rhamnosus* DR20, *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* on monocyte-derived dendritic cells. *Journal of Functional Foods* **2016**, *22*, 300-312, doi:10.1016/j.jff.2016.01.033.
59. Olivares, M.; Diaz-Ropero, M. P.; Sierra, S.; Lara-Villoslada, F.; Fonolla, J.; Navas, M.; Rodriguez, J. M.; Xaus, J., Oral intake of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 enhances the effects of influenza vaccination. *Nutrition* **2007**, *23*, (3), 254-60, doi:10.1016/j.nut.2007.01.004.
60. Maldonado-Lobon, J. A.; Diaz-Lopez, M. A.; Carputo, R.; Duarte, P.; Diaz-Ropero, M. P.; Valero, A. D.; Sanudo, A.; Sempere, L.; Ruiz-Lopez, M. D.; Banuelos, O.; Fonolla, J.; Olivares Martin, M., *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 Reduces *Staphylococcus* Load in the Breastmilk of Lactating Mothers Suffering Breast Pain: A Randomized Controlled Trial. *Breastfeed Med* **2015**, *10*, (9), 425-32, doi:10.1089/bfm.2015.0070.
61. Hor, Y. Y.; Lew, L. C.; Jaafar, M. H.; Lau, A. S.; Ong, J. S.; Kato, T.; Nakanishi, Y.; Azzam, G.; Azlan, A.; Ohno, H.; Liong, M. T., *Lactobacillus* sp. improved microbiota and metabolite profiles of aging rats. *Pharmacol Res* **2019**, *146*, 104312, doi:10.1016/j.phrs.2019.104312.
62. Hor, Y. Y.; Ooi, C. H.; Lew, L. C.; Jaafar, M. H.; Lau, A. S.; Lee, B. K.; Azlan, A.; Choi, S. B.; Azzam, G.; Liong, M. T., The molecular mechanisms of probiotic strains in improving ageing bone and muscle of d-galactose-induced ageing rats. *J Appl Microbiol* **2021**, *130*, (4), 1307-1322, doi:10.1111/jam.14776.
63. Lew, L. C.; Hor, Y. Y.; Jaafar, M. H.; Lau, A. S. Y.; Ong, J. S.; Chuah, L. O.; Yap, K. P.; Azzam, G.; Azlan, A.; Liong, M. T., *Lactobacilli* modulated AMPK activity and prevented telomere shortening in ageing rats. *Benef Microbes* **2019**, *10*, (8), 883-892, doi:10.3920/BM2019.0058.
64. Lehri, B.; Seddon, A.; Karlyshev, A., Discovery and characterisation of a novel plasmid of a probiotic strain *Lactobacillus fermentum* 3872. **2014**, doi:
65. Anderson, R. C.; Cookson, A. L.; McNabb, W. C.; Kelly, W. J.; Roy, N. C., *Lactobacillus plantarum* DSM 2648 is a potential probiotic that enhances intestinal barrier function. *FEMS Microbiology Letters* **2010**, *309*, (2), 184-192, doi:10.1111/j.1574-6968.2010.02038.x.
66. Archer, A. C.; Kurrey, N. K.; Halami, P. M., In vitro adhesion and anti-inflammatory properties of native *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus delbrueckii* spp. *J Appl Microbiol* **2018**, *125*, (1), 243-256, doi:10.1111/jam.13757.
67. Rogosa, M.; Wiseman, R.; Mitchell, J. A.; Disraely, M.; Beaman, A., Species differentiation of oral lactobacilli from man including descriptions of *Lactobacillus salivarius* nov spec and *Lactobacillus cellobiosus* nov spec. *Journal of Bacteriology* **1953**, *65*, (6), 681-699, doi:
68. Dellaglio, F.; Torriani, S.; Felis, G. E., Reclassification of *Lactobacillus cellobiosus* Rogosa et al. 1953 as a later synonym of *Lactobacillus fermentum* Beijerinck 1901. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **2004**, *54*, (3), 809-812, doi:10.1099/ijs.0.02947-0.
69. Tsuchida, S.; Nezu, M.; Tsukahara, M.; Ogura, Y.; Hayashi, T.; Ushida, K., Draft Genome Sequence of *Lactobacillus gorillae* Strain KZ01T, Isolated from a Western Lowland Gorilla. *Genome Announc* **2015**, *3*, (5), e01196-15, doi:10.1128/genomeA.01196-15.
70. Oliveira, L. C.; Saraiva, T. D.; Silva, W. M.; Pereira, U. P.; Campos, B. C.; Benevides, L. J.; Rocha, F. S.; Figueiredo, H. C.; Azevedo, V.; Soares, S. C., Analyses of the probiotic property and stress resistance-related genes of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 2118 through comparative genomics and in vitro assays. *PLoS One* **2017**, *12*, (4), e0175116, doi:10.1371/journal.pone.0175116.
71. Jayashree, S.; Pooja, S.; Pushpanathan, M.; Rajendhran, J.; Gunasekaran, P., Identification and characterization of bile salt hydrolase genes from the genome of *Lactobacillus fermentum* MTCC 8711. *Appl Biochem Biotechnol* **2014**, *174*, (2), 855-66, doi:10.1007/s12010-014-1118-5.
72. John, G. S.; Brot, N.; Ruan, J.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Weissbach, H.; Nathan, C., Peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli* and *Mycobacterium tuberculosis* protects bacteria against oxidative damage from reactive nitrogen intermediates. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, *98*, (17), 9901-9906, doi:10.1073/pnas.161295398.

73. Skaar, E. P.; Tobiason, D. M.; Quick, J.; Judd, R. C.; Weissbach, H.; Etienne, F.; Brot, N.; Seifert, H. S., The outer membrane localization of the *Neisseria gonorrhoeae* MsrA/B is involved in survival against reactive oxygen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99*, (15), 10108-10113, doi:10.1073/pnas.152334799.
74. Brot, N.; Weissbach, H., Peptide methionine sulfoxide reductase: biochemistry and physiological role. *Biopolymers* **2000**, *55*, (4), 288-96, doi:10.1002/1097-0282(2000)55:4<288::AID-BIP1002>3.0.CO;2-M.
75. Ruas-Madiedo, P.; Gueimonde, M.; Margolles, A.; de los Reyes-Gavilan, C. G.; Salminen, S., Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus. *J Food Prot* **2006**, *69*, (8), 2011-5, doi:10.4315/0362-028x-69.8.2011.
76. Kapse, N. G.; Engineer, A. S.; Gowdaman, V.; Wagh, S.; Dhakephalkar, P. K., Functional annotation of the genome unravels probiotic potential of *Bacillus coagulans* HS243. *Genomics* **2019**, *111*, (4), 921-929, doi:10.1016/j.ygeno.2018.05.022.
77. Heinemann, C.; van Hylckama Vlieg, J. E.; Janssen, D. B.; Busscher, H. J.; van der Mei, H. C.; Reid, G., Purification and characterization of a surface-binding protein from *Lactobacillus fermentum* RC-14 that inhibits adhesion of *Enterococcus faecalis* 1131. *FEMS microbiology letters* **2000**, *190*, (1), 177-180, doi:10.1111/j.1574-6968.2000.tb09282.x.
78. Varma, P.; Dinesh, K. R.; Menon, K. K.; Biswas, R., *Lactobacillus fermentum* isolated from human colonic mucosal biopsy inhibits the growth and adhesion of enteric and foodborne pathogens. *J Food Sci* **2010**, *75*, (9), M546-51, doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01818.x.
79. Marcotte, H.; Ferrari, S.; Cesena, C.; Hammarstrom, L.; Morelli, L.; Pozzi, G.; Oggioni, M. R., The aggregation-promoting factor of *Lactobacillus crispatus* M247 and its genetic locus. *J Appl Microbiol* **2004**, *97*, (4), 749-56, doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02364.x.
80. Martín, R.; Sánchez, B.; Suárez, J. E.; Urdaci, M. C., Characterization of the adherence properties of human *Lactobacilli* strains to be used as vaginal probiotics. *FEMS microbiology letters* **2012**, *328*, (2), 166-173, doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02495.x.
81. Cotter, P. D.; Ross, R. P.; Hill, C., Bacteriocins—a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology* **2013**, *11*, (2), 95-105, doi:10.1038/nrmicro2937.
82. Wannun, P.; Piwat, S.; Teanpaisan, R., Purification, Characterization, and Optimum Conditions of Fermencin SD11, a Bacteriocin Produced by Human Orally *Lactobacillus fermentum* SD11. *Appl Biochem Biotechnol* **2016**, *179*, (4), 572-82, doi:10.1007/s12010-016-2014-y.
83. Nilsen, T.; Nes, I. F.; Holo, H., Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl Environ Microbiol* **2003**, *69*, (5), 2975-84, doi:10.1128/AEM.69.5.2975-2984.2003.
84. European Food Safety Authority (EFSA), Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA—Opinion of the Scientific Committee. *EFSA Journal* **2007**, *5*, (12), 587, doi:10.2903/j.efsa.2007.587.
85. Nawaz, M.; Wang, J.; Zhou, A.; Ma, C.; Wu, X.; Moore, J. E.; Millar, B. C.; Xu, J., Characterization and transfer of antibiotic resistance in lactic acid bacteria from fermented food products. *Curr Microbiol* **2011**, *62*, (3), 1081-9, doi:10.1007/s00284-010-9856-2.
86. Palmer, K. L.; Gilmore, M. S., Multidrug-resistant enterococci lack CRISPR-cas. *mBio* **2010**, *1*, (4), e00227-10, doi:10.1128/mBio.00227-10.
87. McClelland, R. S.; Richardson, B. A.; Hassan, W. M.; Graham, S. M.; Kiarie, J.; Baeten, J. M.; Mandaliya, K.; Jaoko, W.; Ndinya-Achola, J. O.; Holmes, K. K., Prospective study of vaginal bacterial flora and other risk factors for vulvovaginal candidiasis. *J Infect Dis* **2009**, *199*, (12), 1883-90, doi:10.1086/599213.
88. Pramanick, R.; Mayadeo, N.; Warke, H.; Begum, S.; Aich, P.; Aranha, C., Vaginal microbiota of asymptomatic bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis: Are they different from normal microbiota? *Microb Pathog* **2019**, *134*, 103599, doi:10.1016/j.micpath.2019.103599.
89. Willems, H. M. E.; Ahmed, S. S.; Liu, J.; Xu, Z.; Peters, B. M., Vulvovaginal Candidiasis: A Current Understanding and Burning Questions. *J Fungi (Basel)* **2020**, *6*, (1), doi:10.3390/jof6010027.

90. Fuochi, V.; Cardile, V.; Petronio Petronio, G.; Furneri, P. M., Biological properties and production of bacteriocins-like-inhibitory substances by *Lactobacillus* sp. strains from human vagina. *J Appl Microbiol* **2019**, 126, (5), 1541-1550, doi:10.1111/jam.14164.
91. Itapary Dos Santos, C.; Ramos Franca, Y.; Duarte Lima Campos, C.; Quaresma Bomfim, M. R.; Oliveira Melo, B.; Assuncao Holanda, R.; Santos, V. L.; Gomes Monteiro, S.; Buoizzi Moffa, E.; Souza Monteiro, A.; Andrade Monteiro, C.; Monteiro-Neto, V., Antifungal and Antivirulence Activity of Vaginal *Lactobacillus* Spp. Products against *Candida* Vaginal Isolates. *Pathogens* **2019**, 8, (3), 150, doi:10.3390/pathogens8030150.
92. Wang, S.; Wang, Q.; Yang, E.; Yan, L.; Li, T.; Zhuang, H., Antimicrobial Compounds Produced by Vaginal *Lactobacillus crispatus* Are Able to Strongly Inhibit *Candida albicans* Growth, Hyphal Formation and Regulate Virulence-related Gene Expressions. *Front Microbiol* **2017**, 8, 564, doi:10.3389/fmicb.2017.00564.

4 CONCLUSÕES

Os dados do presente trabalho indicaram que a análise genômica foi essencial para caracterização da linhagem *L. fermentum* ATCC 23271 como probiótico, particularmente ao fornecer informações que reiteraram achados fenotípicos e ao evidenciar novos dados, uma vez que a linhagem:

1) Apresenta genes com similaridade aos que codificam para ATP-sintases, Lactato desidrogenase, GTP pirofosfoquinase, Piruvato quinase, Isomerase de glicose-6-fosfato, proteínas da família das Hidrolases de coloilglicina, entre outros genes de sistemas proteicos envolvidos na tolerância ao pH ácido, enzimas digestivas e sais biliares, conseqüentemente promoveriam a sobrevivência da linhagem no trânsito pelo trato gastrintestinal;

2) Possui genes associados às propriedades de adesão e de coagregação, tais como a proteína precursora de agregação, o fator promotor de agregação, a galactosefosfotransferase de undecaprenil-fosfato, proteína fosfoquinase de tirosina, a proteína ligadora de fibronectina, entre outras. Tais achados sugerem a sua capacidade de colonização de mucosas, uma propriedade importante para um probiótico;

3) Contem um gene que codifica para uma proteína hipotética com 48% de similaridade com Enterolisina A, produzida por *Enterococcus faecalis*, cuja análise *in silico* da sequência de aminoácidos sugeriu elevada atividade antimicrobiana;

4) A análise fenotípica constatou que possui capacidade de interferir com a adesão de *Candida*, principalmente três linhagens clínicas: *C. krusei* GJFD, *C. albicans* CAS e *C. parapsilosis* RCL no ensaio de competição;

5) Apresentou antagonismo contra *C. albicans* ATCC 90028 e *C. parapsilosis* ATCC 69349, o qual pode estar relacionado à produção de ácidos e/ou de potencial bacteriocina;

6) Apresentou capacidade de sobreviver a condições similares às do trato gastrointestinal, uma vez que um percentual significativo de suas células tolerou a exposição ao pH ácido e aos sais biliares;

7) O seu perfil de resistência está em concordância com outros trabalhos que mostraram resistência intrínseca a alguns antibióticos. Associado a isto, a análise *in silico* revelou que a linhagem não possui genes de resistência adquirida e nem genes de virulência. Tais achados indicam a sua segurança para uso humano ao não possuir genes de resistência transferíveis para outras bactérias e não ser considerada patogênica.

REFERÊNCIAS

ABRAMOV, V. et al. Probiotic properties of *Lactobacillus crispatus* 2,029: homeostatic interaction with cervicovaginal epithelial cells and antagonistic activity to genitourinary pathogens. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 6, n. 3-4, p. 165-176, 2014.

ABRAMOV, V. et al. **Strain *Lactobacillus fermentum* having broad spectrum of antagonistic activity and probiotic lactobacteria consortium for manufacturing bacterial preparations**, 2014.

ABRUZZO, A. et al. Novel mixed vesicles containing lactobacilli biosurfactant for vaginal delivery of an anti-Candida agent. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 112, p. 95-101, 2018.

ABRUZZO, A. et al. *Lactobacillus crispatus* BC1 biosurfactant delivered by hyalurosomes: An advanced strategy to counteract *Candida* biofilm. **Antibiotics**, v. 10, n. 1, p. 33, 2021.

ALE, E. C. et al. Functional properties of exopolysaccharide (EPS) extract from *Lactobacillus fermentum* Lf2 and its impact when combined with *Bifidobacterium animalis* INL1 in yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 96, p. 114-125, 2019.

ALE, E. C. et al. *Lactobacillus fermentum*: Could EPS production ability be responsible for functional properties?. **Food microbiology**, v. 90, p. 103465, 2020.

ALLONSIUS, C. N. et al. Inhibition of *Candida albicans* morphogenesis by chitinase from *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2019.

AMIŽIĆ, I. P. et al. Antimicrobial efficacy of probiotic-containing toothpastes: an in vitro evaluation. **Medicinski Glasnik**, v. 14, n. 1, 2017.

ANDERSON, R. C. et al. Human oral isolate *Lactobacillus fermentum* AGR1487 induces a pro-inflammatory response in germ-free rat colons. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2016.

ANDRADE, J. C. et al. Application of probiotics in candidiasis management. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1-16, 2021.

ARCHER, A.C.; HALAMI, P.M. Probiotic attributes of *Lactobacillus fermentum* isolated from human feces and dairy products. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 19, p.8113-8123, 2015.

ARCHER, A.C.; KURREY, N.K.; HALAMI, P.M. In vitro adhesion and anti-inflammatory properties of native *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus delbrueckii* spp. **Journal of applied microbiology**, v. 125, n. 1, p.243-256, 2018.

ARCHER, A. C.; MUTHUKUMAR, S. P.; HALAMI, P. M. *Lactobacillus fermentum* MCC2759 and MCC2760 Alleviate Inflammation and Intestinal Function in High-Fat Diet-Fed and Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, p. 1-13, 2021.

AZAD, M. et al. Immunomodulatory effects of probiotics on cytokine profiles. **BioMed research international**, v. 2018, 2018..

BATDORJ, B. et al. Isolation, taxonomic identification and hydrogen peroxide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* T31, isolated from Mongolian yoghurt: inhibitory activity on food-borne pathogens. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 3, p. 584-593, 2007.

BERNINI, L. J. et al. Effect of *Bifidobacterium lactis* HN019 on inflammatory markers and oxidative stress in subjects with and without the metabolic syndrome. **British Journal of Nutrition**, v. 120, n. 6, p. 645-652, 2018.

BHAWAL, S. et al. Physicochemical Characteristics of Novel Cell-Bound Exopolysaccharide from Probiotic *Limosilactobacillus fermentum* (MTCC 5898) and Its Relation to Antioxidative Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 35, p. 10338-10349, 2021.

BORMAN, A. M.; SZEKELY, A.; JOHNSON, E. M. Comparative pathogenicity of United Kingdom isolates of the emerging pathogen *Candida auris* and other key pathogenic *Candida* species. **MSphere**, v. 1, n. 4, p. e00189-16, 2016.

BROCKLEHURST, T. F.; LUND, B. M. The influence of pH, temperature and organic acids on the initiation of growth of *Yersinia enterocolitica*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 69, n. 3, p. 390-397, 1990.

CARMO, M. S. et al. *Lactobacillus fermentum* ATCC 23271 displays in vitro inhibitory activities against *Candida* spp. *Front. Microbiol.* v. 7, 2016

CASTRO-BRAVO, N. et al. Interactions of surface exopolysaccharides from *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* within the intestinal environment. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2426, 2018.

CHAABANE, F. et al. Review on antifungal resistance mechanisms in the emerging pathogen *Candida auris*. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 2788, 2019.

CHEN, H. et al. Decolorization of water and oil-soluble azo dyes by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus fermentum*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 12, p. 1459, 2009.

CHUGH, B.; KAMAL-ELDIN, A. Bioactive compounds produced by probiotics in food products. **Current Opinion in Food Science**, v. 32, p. 76-82, 2020.

ČITAR, M. et al. Human intestinal mucosa-associated *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with probiotic properties modulate IL-10, IL-6 and IL-12 gene expression in THP-1 cells. **Beneficial Microbes**, v. 6, n. 3, p. 325-336, 2015.

CLEVELAND, A. A. et al. Declining incidence of candidemia and the shifting epidemiology of *Candida* resistance in two US metropolitan areas, 2008–2013: results from population-based surveillance. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0120452, 2015.

COSSEAU, C. et al. The commensal *Streptococcus salivarius* K12 downregulates the innate immune responses of human epithelial cells and promotes host-microbe

homeostasis. **Infection and immunity**, v. 76, n. 9, p. 4163-4175, 2008.

COSTABILE, A. et al. An in vivo assessment of the cholesterol-lowering efficacy of *Lactobacillus plantarum* ECGC 13110402 in normal to mildly hypercholesterolaemic adults. **PloS one**, v. 12, n. 12, p. e0187964, 2017.

COTTIER, F. et al. The transcriptional stress response of *Candida albicans* to weak organic acids. **G3: genes, genomes, genetics**, v. 5, n. 4, p. 497-505, 2015.

CRAMER, J. A.; PRESTEGARD, J. H. NMR studies of pH-induced transport of carboxylic acids across phospholipid vesicle membranes. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 75, n. 2, p. 295-301, 1977.

CUKROWSKA, B. et al. The Effectiveness of Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei* Strains in Children with Atopic Dermatitis and Cow's Milk Protein Allergy: A Multicenter, Randomized, Double Blind, Placebo Controlled Study. **Nutrients**, v. 13, n. 4, p. 1169, 2021.

DAHL, T. A.; MIDDEN, W. R.; HARTMAN, P. E. Comparison of killing of gram-negative and gram-positive bacteria by pure singlet oxygen. **Journal of bacteriology**, v. 171, n. 4, p. 2188-2194, 1989.

DANIELE, M.; PASCUAL, L.; BARBERIS, L. Curative effect of the probiotic strain *Lactobacillus fermentum* L 23 in a murine model of vaginal infection by *Gardnerella vaginalis*. **Letters in applied microbiology**, v. 59, n. 1, p. 93-98, 2014.

DE VUYST, L.; VANDAMME, E. J. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In: **Bacteriocins of lactic acid bacteria**. Springer, Boston, MA, 1994. p. 91-142.

DENNING, D. W. et al. Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 11, p. e339-e347, 2018.

DERAZ, S. F. et al. Production and physicochemical characterization of acidocin D20079, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 7, p. 911-921, 2007.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular biology reviews**, v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.

DITTOE, D. K.; RICKE, S. C.; KIESS, A. S. Organic acids and potential for modifying the avian gastrointestinal tract and reducing pathogens and disease. **Frontiers in veterinary science**, v. 5, p. 216, 2018.

DORON, S. I.; HIBBERD, P. L.; GORBACH, S. L. Probiotics for prevention of antibiotic-associated diarrhea. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 42, p. S58-S63, 2008.

EKLUND, T. The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 54, n. 3, p. 383-389, 1983.

ELLIS, D. Amphotericin B: spectrum and resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. suppl_1, p. 7-10, 2002.

ENGEVIK, M. A. et al. Immunomodulation of dendritic cells by *Lactobacillus reuteri* surface components and metabolites. **Physiological reports**, v. 9, n. 2, p. e14719, 2021.

FALAGAS, M. E.; MAKRIS, G. C. Probiotic bacteria and biosurfactants for nosocomial infection control: a hypothesis. **Journal of Hospital Infection**, v. 71, n. 4, p. 301-306, 2009.

FANG, F. et al. Characterization of a *Lactobacillus brevis* strain with potential oral probiotic properties. **BMC microbiology**, v. 18, n. 1, p. 1-9, 2018.

FANG, H.-R. et al. Efficacy of *Lactobacillus*-supplemented triple therapy for *Helicobacter pylori* infection in children: a meta-analysis of randomized controlled trials. **European journal of pediatrics**, v. 178, n. 1, p. 7-16, 2019.

FATHI, N. et al. Sequence-identification of *Candida* species isolated from candidemia. **Advanced biomedical research**, v. 5, 2016.

FIDEL JÚNIOR, P. L. Distinct protective host defenses against oral and vaginal candidiasis. **Medical Mycology**, v. 40, p. 359-37.

FRIEDMAN, D. Z. P.; SCHWARTZ, I. S. Emerging fungal infections: new patients, new patterns, and new pathogens. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 3, p. 67, 2019.

GAGLIARDI, A. et al. Rebuilding the gut microbiota ecosystem. **International journal of environmental research and public health**, v. 15, n. 8, p. 1679, 2018.

GAO, J. et al. Candida albicans gains azole resistance by altering sphingolipid composition. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2018.

GARCIA-CASTILLO, V. et al. The exopolysaccharide of Lactobacillus fermentum UCO-979C is partially involved in its immunomodulatory effect and its ability to improve the resistance against Helicobacter pylori infection. **Microorganisms**, v. 8, n. 4, p. 479, 2020.

GIORDANI, B. et al. Liposomes containing biosurfactants isolated from Lactobacillus gasseri exert antibiofilm activity against methicillin resistant Staphylococcus aureus strains. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 139, p. 246-252, 2019.

GLOBAL PROBIOTIC MARKET IS SET FOR RAPID GROWTH AND IS EXPECTED TO REACH VALUE AROUND USD 65.87 BILLION BY 2024 (Zion Market Research, 2018).

GONÇALVES, B. et al. Vulvovaginal candidiasis: epidemiology, microbiology and risk factors. **Critical reviews in microbiology**, v. 42, n. 6, p. 905-927, 2016.

GROVER, N. D. Echinocandins: A ray of hope in antifungal drug therapy. **Indian journal of pharmacology**, v. 42, n. 1, p. 9, 2010.

GUDIÑA, E. J. et al. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from Lactobacillus paracasei ssp. paracasei A20. **Letters in applied microbiology**, v. 50, n. 4, p. 419-424, 2010.

HAN, X. et al. Lactobacillus rhamnosus GG prevents epithelial barrier dysfunction induced by interferon-gamma and fecal supernatants from irritable bowel syndrome patients in human intestinal enteroids and colonoids. **Gut Microbes**, v. 10, n. 1, p. 59-76, 2019.

HARRIOTT, M. M. et al. Candida albicans forms biofilms on the vaginal mucosa. **Microbiology**, v. 156, n. Pt 12, p. 3635, 2010.

HEARPS, Anna et al. Lactic acid, a vaginal microbiota metabolite, elicits an anti-inflammatory response from vaginal and cervical epithelial cells. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 30, n. S1, p. A238-A239, 2014.

HEARPS, A. C. et al. Vaginal lactic acid elicits an anti-inflammatory response from human cervicovaginal epithelial cells and inhibits production of pro-inflammatory mediators associated with HIV acquisition. **Mucosal immunology**, v. 10, n. 6, p. 1480-1490, 2017.

HEFZY, E. M. et al. Bacteriocin-Like Inhibitory Substances from Probiotics as Therapeutic Agents for Candida Vulvovaginitis. **Antibiotics**, v. 10, n. 3, p. 306, 2021.

HERTZBERGER, R. et al. H₂O₂ production in species of the Lactobacillus acidophilus group: a central role for a novel NADH-dependent flavin reductase. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 7, p. 2229-2239, 2014.

HILL, C. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, 2014.

HOF, H. A new, broad-spectrum azole antifungal: posaconazole—mechanisms of action and resistance, spectrum of activity. **Mycoses**, v. 49, p. 2-6, 2006.

HOR, Y.-Y. et al. Lactobacillus strains alleviated aging symptoms and aging-induced metabolic disorders in aged rats. **Journal of medicinal food**, v. 22, n. 1, p. 1-13, 2018.

HOR, Y.-Y. et al. Lactobacillus sp. improved microbiota and metabolite profiles of aging rats. **Pharmacological research**, v. 146, p. 104312, 2019.

HOR, Y.-Y. et al. The molecular mechanisms of probiotic strains in improving ageing bone and muscle of d-galactose-induced ageing rats. **Journal of applied microbiology**, v. 130, n. 4, p. 1307-1322, 2021.

ISOLAURI, E. Probiotics in human disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 73, p. S1142-S1146, 2001.

JAMES, K. M. et al. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation and modulation of gene expression by probiotic cells and supernatant. **Journal of medical microbiology**, v. 65, n. 4, p. 328-336, 2016.

JAMES, R.; LAZDUNSKI, C.; PATTUS, F. (Ed.). **Bacteriocins, microcins and lantibiotics**. Springer Science & Business Media, 2013.

JANG, S. Y. et al. Genome characteristics of *Lactobacillus fermentum* strain JDFM216 for application as probiotic bacteria. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 27, n. 7, p. 1266-1271, 2017.

KERRY, R. G. et al. Benefaction of probiotics for human health: A review. **Journal of food and drug analysis**, v. 26, n. 3, p. 927-939, 2018.

KIM, K. et al. Exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* LRCC5310 offers protection against rotavirus-induced diarrhea and regulates inflammatory response. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 7, p. 5702-5712, 2018.

KIM, W.-G. et al. *Bifidobacterium longum* IM55 and *Lactobacillus plantarum* IM76 alleviate allergic rhinitis in mice by restoring Th2/Treg imbalance and gut microbiota disturbance. **Beneficial microbes**, v. 10, n. 1, p. 55-67, 2019.

KLAENHAMMER, T. R. et al. Functional genomics of probiotic *Lactobacilli*. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 42, p. S160-S162, 2008.

KÖHLER, G. A.; ASSEFA, S.; REID, G. Probiotic interference of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 with the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. **Infectious diseases in obstetrics and gynecology**, v. 2012, 2012.

KONG, S.; DAVISON, A. J. The role of interactions between O₂, H₂O₂, ·OH, e⁻ and O₂⁻ in free radical damage to biological systems. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 204, n. 1, p. 18-29, 1980.

KOVACHEV, S. M.; VATCHEVA-DOBREVSKA, R. S. Local probiotic therapy for vaginal *Candida albicans* infections. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 7, n. 1, p. 38-44, 2015.

KULKARNI, P.; CHAKRABORTY, R.; CHAKRABORTY, S. Biosurfactant mediated synthesis of silver nanoparticles using *Lactobacillus brevis* (MTCC 4463) and their antimicrobial studies. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 10, p. 1753-1759, 2019.

KULLBERG, B. J.; ARENDRUP, M. C. Invasive candidiasis. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 15, p. 1445-1456, 2015.

LAI, H.-H. et al. Probiotic *Lactobacillus casei*: effective for managing childhood diarrhea by altering gut microbiota and attenuating fecal inflammatory markers. **Nutrients**, v. 11, n. 5, p. 1150, 2019.

LASS-FLÖRL, C. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. **Mycoses**, v. 52, n. 3, p. 197-205, 2009.

LE, B.; YANG, S. H. Efficacy of *Lactobacillus plantarum* in prevention of inflammatory bowel disease. **Toxicology reports**, v. 5, p. 314-317, 2018.

LEÃO, M. V. P. et al. *Lactobacillus rhamnosus* intake can prevent the development of candidiasis. **Clinical oral investigations**, v. 22, n. 7, p. 2511-2518, 2018.

LEE, Y. et al. Antifungal drug resistance: molecular mechanisms in *Candida albicans* and beyond. **Chemical reviews**, v. 121, n. 6, p. 3390-3411, 2020.

LEHRI, B.; SEDDON, A. M.; KARLYSHEV, A. V. *Lactobacillus fermentum* 3872 genome sequencing reveals plasmid and chromosomal genes potentially involved in a probiotic activity. **FEMS in Microbiology Letters**, v. 362, n. 11, p. fnv068, 2015.

LEHRI, B.; SEDDON, A. M.; KARLYSHEV, A. V. Potential probiotic-associated traits revealed from completed high quality genome sequence of *Lactobacillus fermentum* 3872. **Standard in Genomic Sciences**, v. 12, n. 1, p. 19, 2017a.

LEHRI, B.; SEDDON, A. M.; KARLYSHEV, A. V. *Lactobacillus fermentum* 3872 as a potential tool for combatting *Campylobacter jejuni* infections. **Virulence**, v. 8, n. 8, p. 1753-1760, 2017b.

LIM, S.-M. et al. *Lactobacillus fermentum* IM12 attenuates inflammation in mice by inhibiting NF- κ B-STAT3 signalling pathway. **Beneficial microbes**, v. 8, n. 3, p. 407-419, 2017.

LIN, S.-C. Biosurfactants: recent advances. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental AND Clean Technology**, v. 66, n. 2, p. 109-120, 1996.

LIU, H.-N. et al. Altered molecular signature of intestinal microbiota in irritable bowel syndrome patients compared with healthy controls: a systematic review and meta-analysis. **Digestive and Liver Disease**, v. 49, n. 4, p. 331-337, 2017.

LOMAN, N. J. et al. High-throughput bacterial genome sequencing: an embarrassment of choice, a world of opportunity. **Nature Reviews in Microbiology**, v. 10, p. 599-606, 2012.

MAGILL, S. S. et al. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 13, p. 1198-1208, 2014.

MALDONADO, A.; RUIZ-BARBA, J. L.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. Production of plantaricin NC8 by *Lactobacillus plantarum* NC8 is induced in the presence of different types of gram-positive bacteria. **Archives of Microbiology**, v. 181, n. 1, p. 8-16, 2004.

MATSUBARA, V. H. et al. Probiotic lactobacilli inhibit early stages of *Candida albicans* biofilm development by reducing their growth, cell adhesion, and filamentation. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 14, p. 6415-6426, 2016.

MCCARTY, T. P.; PAPPAS, P. G. Invasive candidiasis. **Infectious Disease Clinics**, v. 30, n. 1, p. 103-124, 2016.

MELO, T. A. et al. Inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm by *Lactobacillus* isolated from fine cocoa. **BMC microbiology**, v. 16, n. 1, p. 1-9, 2016.

MOHSIN, Z. A.; ALI, W. S. Antagonistic Activity of Bacteriocin-producing *Lactobacillus* Against *Candida* spp. **Iraqi Journal of Science**, p. 2153-2162, 2021.

MUNDULA, T. et al. Effect of probiotics on oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. **Nutrients**, v. 11, n. 10, p. 2449, 2019.

NADA, H. G. et al. *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium longum* exhibit antiproliferation, anti-angiogenesis of gastric and bladder cancer: Impact of COX2 inhibition. **PharmaNutrition**, v. 14, p. 100219, 2020.

NAMI, S. et al. Fungal vaccines, mechanism of actions and immunology: a comprehensive review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 333-344, 2019.

NOVERR, M. C.; HUFFNAGLE, G. B. Regulation of *Candida albicans* morphogenesis by fatty acid metabolites. **Infection and immunity**, v. 72, n. 11, p. 6206-6210, 2004.

OGUNSHE, A. A. O.; OMOTOSO, M. A.; BELLO, V. B. The in vitro antimicrobial activities of metabolites from *Lactobacillus* strains on *Candida* species implicated in *Candida* vaginitis. **The Malaysian journal of medical sciences: MJMS**, v. 18, n. 4, p. 13, 2011.

OLIVEIRA, M. N. de et al. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p. 1-21, 2002.

OLIVEIRA, S. C. et al. An alternative respiratory pathway on *Candida krusei*: implications on susceptibility profile and oxidative stress. **FEMS yeast research**, v. 12, n. 4, p. 423-429, 2012.

ONISHI, J. et al. Discovery of novel antifungal (1, 3)- β -D-glucan synthase inhibitors. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 2, p. 368-377, 2000.

OZEN, M.; DINLEYICI, E. C. The history of probiotics: the untold story. **Beneficial microbes**, v. 6, n. 2, p. 159-165, 2015.

PAPPAS, P. G. et al. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 1-20, 2018.

PARK, J.-S. et al. Characterization of *Lactobacillus fermentum* PL9988 isolated from healthy elderly Korean in a longevity village. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 25, n. 9, p. 1510-1518, 2015.

PARK, M. R. et al. Probiotic *Lactobacillus fermentum* strain JDFM216 stimulates the longevity and immune response of *Caenorhabditis elegans* through a nuclear hormone receptor. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018.

PERLIN, D. S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 12, p. e383-e392, 2017.

PERONI, D. G.; MORELLI, L. Probiotics as Adjuvants in Vaccine Strategy: Is There More Room for Improvement?. **Vaccines**, v. 9, n. 8, p. 811, 2021.

PIARD, J. C.; DESMAZEAUD, M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. **Le lait**, v. 71, n. 5, p. 525-541, 1991.

PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 7, p. 792-798, 2019.

QIN Q. L. et al. A proposed genus boundary for the prokaryotes based on genomic insights. **Journal of Bacteriology**, v. 196, p. 2210-2215, 2014.

RAMOS, C. L. et al. Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products. **Food microbiology**, v. 36, n. 1, p. 22-29, 2013.

RAMÍREZ-QUIJAS, M. D.; LÓPEZ-ROMERO, E.; CUÉLLAR-CRUZ, M. Proteomic analysis of cell wall in four pathogenic species of *Candida* exposed to oxidative stress. **Microbial pathogenesis**, v. 87, p. 1-12, 2015.

RIBEIRO, F. C. et al. Action mechanisms of probiotics on *Candida* spp. and candidiasis prevention: an update. **Journal of applied microbiology**, v. 129, n. 2, p. 175-185, 2020.

RICKE, S. C. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. **Poultry science**, v. 82, n. 4, p. 632-639, 2003.

RODRÍGUEZ-SOJO, M. J. et al. *Limosilactobacillus fermentum* CECT5716: Mechanisms and Therapeutic Insights. **Nutrients**, v. 13, n. 3, p. 1016, 2021.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current opinion in biotechnology**, v. 13, n. 3, p. 249-252, 2002.

ROSSONI, R. D. et al. Antifungal activity of clinical *Lactobacillus* strains against *Candida albicans* biofilms: identification of potential probiotic candidates to prevent oral candidiasis. **Biofouling**, v. 34, n. 2, p. 212-225, 2018.

ROSSONI, R. D. et al. The postbiotic activity of *Lactobacillus paracasei* 28.4 against *Candida auris*. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, 2020.

RUAS-MADIEDO, P.; SALAZAR, N.; CLARA, G. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria in food and probiotic applications. In: **Microbial Glycobiology**. Academic Press, 2010. p. 885-902.

SANDERS, M. E. et al. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. **Gastroenterology & Hepatology**. v. 16, n. 605, 2019.

SANGLARD, D.; COSTE, A.; FERRARI, S. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. **FEMS yeast research**, v. 9, n. 7, p. 1029-1050, 2009.

SANGLARD, D.; ODDS, F. C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **The Lancet infectious diseases**, v. 2, n. 2, p. 73-85, 2002.

SARDI, J. C. O. et al. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of medical microbiology**, v. 62, n. 1, p. 10-24, 2013.

SEALE, J. V.; MILLAR, M. Probiotics: a new frontier for infection control. **Journal of Hospital Infection**, v. 84, n. 1, p. 1-4, 2013.

SHARMA, A. Oral candidiasis: An opportunistic infection: A review. **International Journal of Applied Dentistry Science**, v. 5, n. 1, p. 23-7, 2019.

SHENOY, A.; GOTTLIEB, A. Probiotics for oral and vulvovaginal candidiasis: A review. **Dermatologic therapy**, v. 32, n. 4, p. e12970, 2019.

SHERRY, L. et al. Biofilm-forming capability of highly virulent, multidrug-resistant *Candida auris*. **Emerging infectious diseases**, v. 23, n. 2, p. 328, 2017.

SHOKRYAZDAN, P. et al. In Vitro assessment of bioactivities of *Lactobacillus* strains as potential probiotics for humans and chickens. **Journal of food science**, v. 82, n. 11, p. 2734-2745, 2017.

SILVERBERG, J. I.; SILVERBERG, N. B. Epidemiology and extracutaneous comorbidities of severe acne in adolescence: a US population-based study. **British Journal of Dermatology**, v. 170, n. 5, p. 1136-1142, 2014.

SILVI, S. et al. EU project Crownalife: functional foods, gut microflora and healthy ageing: isolation and identification of Lactobacillus and Bifidobacterium strains from faecal samples of elderly subjects for a possible probiotic use in functional foods. **Journal of Food Engineering**, v. 56, n. 2-3, p. 195-200, 2003.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. **TRENDS in Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 142-146, 2004.

SINGH, S. V. B. et al. Hydrogen peroxide-responsive engineered polyoxalate nanoparticles for enhanced wound healing. **Macromolecular Research**, v. 26, n. 1, p. 40-47, 2018.

SINGH, V. P. et al. Role of probiotics in health and disease: a review. **J Pak Med Assoc**, v. 63, n. 2, p. 253-257, 2013.

SOLIERI, L.; DAKAL, T. C.; GIUDICI, P. Next-generation sequencing and its potential impact on food microbial genomics. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 21-37, 2013.

SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. Candida infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

TAGINI, F.; GREUB, G. Bacterial genome sequencing in clinical microbiology: a pathogen-oriented review. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Disease**, v. 36, p. 2007-2020, 2017.

TANG, P. et al. Infection control in the new age of genomic epidemiology. **American Journal of Infection Control**, v. 45, p. 170-179, 2017.

VALLOR, A. C. et al. Factors associated with acquisition of, or persistent colonization by, vaginal lactobacilli: role of hydrogen peroxide production. **The Journal of infectious diseases**, v. 184, n. 11, p. 1431-1436, 2001.

VELJOVIĆ, K. et al. Promotion of early gut colonization by probiotic intervention on microbiota diversity in pregnant sows. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 2028, 2017.

VERMES, A.; GUCHELAAR, H.-J.; DANKERT, J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, n. 2, p. 171-179, 2000.

VICARIOTTO, F. et al. Effectiveness of the association of 2 probiotic strains formulated in a slow release vaginal product, in women affected by vulvovaginal candidiasis: a pilot study. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 46, p. S73-S80, 2012.

VILA, T. et al. Oral candidiasis: a disease of opportunity. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 15, 2020.

VOLTAN, S. et al. Lactobacillus crispatus M247-derived H₂O₂ acts as a signal transducing molecule activating peroxisome proliferator activated receptor- γ in the intestinal mucosa. **Gastroenterology**, v. 135, n. 4, p. 1216-1227, 2008.

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

WANG, K. et al. Physicochemical characteristics and in vitro and in vivo antioxidant activity of a cell-bound exopolysaccharide produced by Lactobacillus fermentum S1. **International journal of biological macromolecules**, v. 139, p. 252-261, 2019b.

WIEDEMANN, I. et al. The mode of action of the lantibiotic lactacin 3147—a complex mechanism involving specific interaction of two peptides and the cell wall precursor lipid II. **Molecular microbiology**, v. 61, n. 2, p. 285-296, 2006.

WILLEMS, H. M. E. et al. Vulvovaginal candidiasis: a current understanding and burning questions. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 27, 2020.

WILLIAMS, N. T. Probiotics. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 67, n. 15, 2010.

WITTOUCK, S.; WUYTS, S.; LEBEER, S. Towards a genome-based reclassification of the genus Lactobacillus. **Applied and environmental microbiology**, v. 85, n. 3, 2019.

ZACHAROF, M. P.; LOVITT, R. W. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. **Apcbee Procedia**, v. 2, p. 50-56, 2012.

ZANGL, I. et al. The role of *Lactobacillus* species in the control of *Candida* via biotrophic interactions. **Microbial Cell**, v. 7, n. 1, p. 1, 2020.

ZHAO, Y. et al. *Lactobacillus fermentum* and its potential immunomodulatory properties. **Journal of functional foods**, v. 56, p. 21-32, 2019.

ZHENG, J. et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. 2020.