

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO BIOLOGIA VEGETAL



**Optimização da Capacidade de Produção de Bacteriocinas
por Bactérias do Ácido Lático**

Marlene Ferreira da Silva

Mestrado em Microbiologia Aplicada

Dissertação orientada por:
Professora Doutora Maria João Fraqueza
Professora Doutora Lélia Chambel



O trabalho apresentado nesta Dissertação de Mestrado foi realizado na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa sob a orientação direta da Professora Doutora Maria João Fraqueza

A Professora Doutora Lélia Chambel foi a orientadora interna, designada no âmbito do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Agradecimentos

O alcançar desta etapa não teria sido possível sem o apoio e amizade que fui encontrando ao longo do meu percurso académico, onde tive a sorte de conhecer pessoas fantásticas que me apoiaram desde o início e que levo no coração para o resto da minha vida.

Não podia deixar de agradecer à minha mãe e melhor amiga, Fernanda Ferreira, pela dedicação, ajuda e principalmente educação, a ela devo-lhe todas as minhas conquistas. À minha avó materna, Elsa Ferreira, que apesar de já não estar entre nós, contribuiu para a pessoa que sou hoje e permanecerá sempre na minha mente e coração.

Gostaria também de agradecer à Zezinha e à Lena pelo apoio, carinho e disponibilidade que sempre tiveram para comigo.

Um especial agradecimento às minhas orientadoras Professora Doutora Maria João Fraqueza e Professora Doutora Lélia Chambel pela oportunidade e orientação.

Queria também agradecer à Sara Conceição, Ana Severo e Rafael Pinto, pela amizade e apoio ao longo deste percurso, apesar da distância. Tenho saudades vossas.

Resumo

Nestes últimos anos tem-se observado uma maior preocupação por temas como o bem-estar físico e a sustentabilidade ambiental, verificando-se uma maior procura, por parte da sociedade, de produtos mais “naturais” e alternativas mais sustentáveis, nos quais se encaixam as bacteriocinas. São moléculas versáteis de origem natural e ação direcionada, que dão cada vez mais provas de serem a resposta para os desafios críticos da sociedade, desde a segurança e conservação dos alimentos até aos cuidados de saúde e à sustentabilidade ambiental.

Neste estudo foram expostas a vários fatores nutricionais (meio de cultura) e ambientais (temperatura e pH) 8 estirpes de *Lactiplantibacillus* (*L. plantarum*, *L. sakei* e *L. curvatus*) no intuito de provocar uma situação de stress metabólico e assim produzirem bacteriocinas.

Inicialmente foi feita a pesquisa de genes produtores de bacteriocinas, por PCR. Todas as estirpes de *L. plantarum* mostraram ter vários genes produtores, enquanto as estirpes de *L. sakei* não acusaram a presença de nenhum dos genes estudados.

Os Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos realizados revelaram algumas resistências à Tetraciclina e Penicilina que determinam que estas estirpes serão potencialmente não seguras.

Em condições de crescimento de não stress, todas as estirpes revelaram ter um poder inibitório não associado a bacteriocinas e após o crescimento em meios de cultura modificados, continuou-se a não verificar uma capacidade de inibição proveniente das bacteriocinas.

Assim neste trabalho não foi possível induzir a produção de bacteriocinas em função das condições testadas.

No futuro seria interessante explorar outras vias de suplementação, como a triptona, ou a criação de um ambiente competitivo *in vitro* pondo estas estirpes a incubar juntamente com estirpes patogénicas.

Palavras-chave: Bacteriocinas; Stress metabólico; *L. plantarum*; *L. sakei*; *L. curvatus*

Abstract

In recent years there has been a greater concern for topics such as physical well-being and environmental sustainability, with a greater demand from society for more “natural” products and more sustainable alternatives, which bacteriocins fit into. They are versatile molecules of natural origin and targeted action and are increasingly proving to be the answer to society's critical challenges, from food safety and preservation to healthcare and environmental sustainability.

In this study, 8 strains of *Lactiplantibacillus* (*L. plantarum*, *L. sakei* and *L. curvatus*) were exposed to various growth conditions in order to cause a situation of metabolic stress and thus produce bacteriocins.

Initially, research was carried out on genes that produce bacteriocins. All *L. plantarum* strains were shown to have several producer genes, while *L. sakei* strains did not show the presence of any of the genes studied.

The Antimicrobial Sensitivity test revealed some worrying resistance to antimicrobials that make these strains unsuitable for human consumption, namely Tetracycline and Penicillin.

Under non-stress growth conditions, all strains revealed an inhibitory power not associated with bacteriocins and after growth in modified culture media and protein purification, there was still no inhibition capacity from bacteriocins.

Therefore, in this work it was not possible to produce bacteriocins as the growth conditions never created a situation of environmental stress.

In the future it would be interesting to explore other supplementation routes, such as tryptone, or the creation of a competitive in vitro environment by growing these strains together with pathogenic strains.

Keywords: Bacteriocins; Metabolic stress; *L. plantarum*; *L. sakei*; *L. curvatus*

Índice

1.	Introdução	1
2.	Revisão bibliográfica	3
2.1.	Bactérias do ácido láctico (BAL).....	3
2.2.	Gêneros <i>Lactiplantibacillus</i> e <i>Latilactobacillus</i>	9
2.3.	Bacteriocinas.....	12
2.4.	Plantaricina e sakacina.....	15
2.5.	Uso tecnológico das bacteriocinas	18
3.	Optimização da capacidade de produção de bacteriocinas por estirpes de <i>Lactiplantibacillus</i> e <i>Latilactobacillus</i>	20
3.1.	Objetivos.....	20
4.	Materiais e métodos.....	20
4.1.	Estirpes microbianas	20
4.1.1.	Origem das estirpes	20
4.1.2.	Cultura e isolamento das estirpes.....	20
4.2.	Caracterização genotípica e fenotípica	21
4.2.1.	Extração e quantificação de DNA genômico.....	21
4.2.2.	Deteção e identificação de genes codificantes de bacteriocinas	21
4.2.3.	Teste de suscetibilidade a antimicrobianos.....	22
4.2.4.	Avaliação do potencial bacteriocinogénico	23
4.3.	Estudo da evolução da população microbiana das estirpes.....	24
4.3.1.	Padronização do inóculo.....	24
4.3.2.	Avaliação da taxa de crescimento populacional das estirpes em estudo em função de diferentes temperaturas	24
4.4.	Avaliação da potencial produção de bacteriocinas em função dos fatores nutricionais e ambientais.....	25
4.4.1.	Preparação dos caldos MRS modificados	25
4.4.2.	Avaliação da potencial produção de bacteriocinas em função dos fatores nutricionais e ambientais.....	25
4.4.3.	Avaliação da potencial presença de bacteriocinas	26
4.4.4.	Semi-purificação de substâncias inibitórias semelhantes a bacteriocinas (BLIS)	27
5.	Resultados e discussão.....	28
5.1.	Deteção e identificação de genes codificantes de bacteriocinas	28
5.2.	Avaliação de potencial bacteriocinogénico	30
5.3.	Teste de suscetibilidade a antimicrobianos.....	31
5.4.	Avaliação da taxa de crescimento populacional das estirpes em estudo em função das diferentes temperaturas	32

5.5. Avaliação da potencial produção de bacteriocinas em função dos fatores nutricionais, temperatura e pH	34
5.6. Avaliação da potencial presença de bacteriocinas	37
6. Conclusões	39
7. Referências bibliográficas	41
A. Materiais suplementares	52

Índice de Figuras

Figura 2.1 - Representação esquemática da fermentação homoláctica (A) e heteroláctica (B). (Adaptado de (Freiberg et al., 2020)).....	4
Figura 5.1 - Revelação de gel de agarase da pesquisa dos genes codificantes das Plantaricinas (A – Plantaricina A e Plantaricina B; B – Plantaricina B e Plantaricina K; C – Plantaricina I e Plantaricina J; D – Plantaricina M e Plantaricina D; E – Plantaricina N e Plantaricina R.....	29
Figura 5.2 - Revelação de gel de agarase da pesquisa dos genes codificantes da Sakacina P e Sakacina A	29
Figura 5.3 - Revelação de gel de agarose da pesquisa dos genes codificantes da Sakacina Q.....	30
Figura 5.4 – Screening de produção de bacteriocinas (sem Proteinase K - à direita; com Proteinase K - à esquerda) A ausência de inibição perto do poço de Proteinase K na imagem à direita, é indicativo que a inibição verificada não é de natureza proteica.	30
Figura 5.5 - Screening ao poder inibitório das estirpes na ausência de stress ambiental e não produzindo bacteriocidas.....	31
Figura 5.6 - Curvas de crescimento utilizadas no cálculo da taxa de replicação e identificação da fase exponencial de crescimento (A - T=30°C e pH inicial=6,3± 0,1; B - 20°C e pH inicial=6,3± 0,1).....	33
Figura 5.7 - Efeito do pH no crescimento microbiano em meio MRS suplementado com Vitamina B (A - T=30°C e pH inicial=6,3± 0,1; B - T=30°C e pH inicial=5,8± 0,1).....	35
Figura 5.8 - Evolução do pH durante a fase exponencial de crescimento microbiano em meio MRS suplementado com Vitamina B (A - T=30°C e pH inicial=6,3± 0,1; B - T=30°C e pH inicial=5,8± 0,1)	35
Figura 5.9 - Efeito dos nutrientes no crescimento microbiano a T=20°C e pH inicial=5,8± 0,1 (A - MRS com extrato de carne 20 g/; B - MRS com extrato de carne 15 g/L)	36
Figura 5.10 - Efeito dos nutrientes no crescimento microbiano a T=30°C e pH inicial=6,3± 0,1 (A - MRS com extrato de carne 20 g/; B - MRS com extrato de carne 15 g/L)	36
Figura 5.11 - Avaliação da potencial presença de bacteriocinas em função dos fatores nutricionais, temperatura e pH, contra <i>Listeria monocytogenes</i> . Os círculos a preto foram adicionados de modo a facilitar a visualização dos halos de inibição.....	37
Figura A.1 - Curvas de Crescimento a 20°C e pH inicial = 5,8 (A – MRS não suplementado; B - MRS com extrato de carne 15 g/; C - MRS com extrato de carne 20 g/L; D - MRS suplementado com Vitamina B; E - MRS suplementado com Ferro).....	52
Figura A.2 - Curvas de Crescimento a 20°C e pH inicial =6,3 (A – MRS não suplementado; B - MRS com extrato de carne 15 g/; C - MRS com extrato de carne 20 g/L; D - MRS suplementado com Vitamina B; E - MRS suplementado com Ferro).....	53
Figura A.3 - Curvas de Crescimento a 30°C e pH inicial =6,3 (A – MRS não suplementado; B - MRS com extrato de carne 15 g/; C - MRS com extrato de carne 20 g/L; D - MRS suplementado com Vitamina B; E - MRS suplementado com Ferro).....	54
Figura A.4 - Curvas de Crescimento a 30°C e pH inicial =5,8 (A – MRS não suplementado; B - MRS com extrato de carne 15 g/; C - MRS com extrato de carne 20 g/L; D - MRS suplementado com Vitamina B; E - MRS suplementado com Ferro).....	55

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 - Bactérias Ácido Lácticas utilizadas em diversos produtos alimentares fermentados.	6
Tabela 2.2 - Lista de antimicrobianos testados, respetiva classe e modo de atuação	10
Tabela 2.3 - Resistências a antimicrobianos e respetivos genes associados mais prevalentes em Lactiplantibacillus e Latilactobacillus presentes em produtos alimentares, na literatura.....	11
Tabela 2.4 - Condições ótimas de crescimento da população bacteriana para produção de bacteriocinas. (*-Crescimento foi realizado em ambiente de competição com Listeria monocytogenes).....	14
Tabela 2.5 - Caracterização de plantaricinas e sakacinas de acordo com a sua estabilidade térmica, pH, sensibilidade enzimática e atividade antimicrobiana.	16
Tabela 2.6 - Aplicações tecnológicas das bacteriocinas em diversos ramos.	18
Tabela 4.1 - Estirpes de trabalho utilizadas neste estudo.....	20
Tabela 4.2 - Primers e condições utilizados na reação de PCR para a deteção de genes produtores de Sakacinas amplificados por PCR.....	22
Tabela 4.3 - Primers e condições utilizados na reação de PCR para a deteção de genes produtores de Plantaricinas amplificados por PCR	22
Tabela 4.4 - Breakpoints de resistência estabelecidos pelo EUCAST 2022 e CLSI 2023, com os respetivos diâmetros de inibição (mm) e designação (S - Sensível, I - Intermédio, R - Resistente).	23
Tabela 4.5 - Condições testadas na avaliação da potencial produção de bacteriocinas em função dos fatores nutricionais, temperatura e pH.	26
Tabela 5.1 - Estudo da presença de genes codificantes de Plantaricinas e Sakacinas (+ - Positivo; - - Negativo; N/T – Não testado).....	28
Tabela 5.2 - Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos com respetivos halos de inibição (em mm) e categorização de acordo com os breakpoints (S – Sensível; I – Intermédio; R – Resistente). (E 15µg - Eritromicina 15 µg; TE 30µg - Tetraciclina 30 µg; VA 30µg - Vancomicina 30 µg; RD 5 µg - Rifampicina 5 µg; CN 10µg - Gentamicina 10 µg; MY 15µg - Lincomicina 15 µg; C 30µg - Clorofenicol 30 µg; P 10UI - Penicilina G 10 UI; QD 15µg - Quinopristina/Dalfopristina 15 µg).....	31
Tabela 5.3 - Contagem de cfu/mL em inóculos com densidades óticas de $0,85 \pm 0,05$	32
Tabela 5.4 - Tempo de Replicação e identificação da fase exponencial de crescimento a 30°C com pH inicial= $6,3 \pm 0,1$, em meio MRS não suplementado	33
Tabela 5.5 - Tempo de Replicação e identificação da fase exponencial de crescimento a 20°C com pH inicial= $6,3 \pm 0,1$, em meio MRS não suplementado	33
Tabela 5.6 - Seleção das 7 condições com resultados mais favoráveis para proceder à fase de semi-purificação.....	37

Abreviaturas

ATP - Trifosfato de adenosina

BAL - Bactérias do Ácido Lático

BHI - *Brain Heart Infusion* (Infusão de Cérebro e Coração)

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute* (Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais)

DNA - *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

EFSA – *European Food Safety Authority* (Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos)

EMP - Embden-Meyerhof-Parnas

EUCAST - *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (Comitê Europeu de Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana)

FDA - *Food and Drug Administration* (Administração de Alimentos e Medicamentos)

GRAS - *Generally regarded as safe* (Geralmente considerado Seguro)

MRS - Man, Rogosa e Sharpe

NAD⁺ – *Nicotinamide Adenine Dinucleotide* (dinucleótido de nicotinamida e adenina - forma oxidada)

NADH – *Nicotinamide Adenine Dinucleotide* (dinucleótido de nicotinamida e adenina - forma reduzida)

OGM - Organismos Geneticamente Modificados

PCR - *Polymerase chain reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

QPS - *Qualified Presumption of Safety* (Presunção Qualificada de Segurança)

Lista de Símbolos e Siglas

°C - Graus Celsius

cfu – Unidades formadoras de colónia

G+C – Rácio de Guanina e Citosina

h – Horas

I - Intermédio

min - Minutos

mm - Milímetros

rpm - Rotações Por Minuto

R - Resistente

S - Sensível

s – Segundo

t – tempo

T- Temperatura

UI – unidades internacionais

1. Introdução

Atualmente vivemos numa sociedade cada vez mais preocupada e exigente, cada vez mais atenta com a sua saúde e com o que come.

A pandemia pelo SARS-CoV-2 veio acentuar esta crescente tendência, verificando-se uma maior preocupação pela escolha de alimentos "biológicos", com redução de sal/açúcar, "sem OGM (Organismos Geneticamente Modificados)", etc. Na saúde verificou-se a mesma tendência com um principal foco na prevenção, seja a partir de atos de boa higiene ou no consumo crescente de suplementos vitamínicos e probióticos, obrigando as empresas a adaptarem-se para cumprirem as exigências dos consumidores e a oferecerem soluções alternativas mais naturais para combater os desafios microbianos que são cada vez mais importantes num mundo preocupado com temas como a resistência aos antibióticos e a sustentabilidade ambiental (Corsetti & Settanni, 2007; Prete et al., 2021)

Assim, as bacteriocinas, uma classe de peptídeos antimicrobianas produzidas por certas bactérias, têm atraído atenção significativa devido às suas propriedades antimicrobianas únicas, especificamente devido à sua capacidade de inibir ou matar seletivamente estirpes bacterianas (Batt, 2014). Essa seletividade, aliada à sua origem natural, torna as bacteriocinas uma alternativa atraente aos antimicrobianos tradicionais em diversas aplicações, nomeadamente na conservação de alimentos, saúde e agricultura.

Estas moléculas são produzidas por bactérias normalmente já utilizadas na fermentação de alimentos há muito anos e são geralmente consideradas seguras, como as do grupo das Bactérias do Ácido Láctico (Settanni et al., 2020).

Estas bactérias são caracterizadas pela capacidade de produzirem ácido láctico durante a fermentação de carboidratos, estando distribuídas em vários ambientes, incluindo no corpo humano, onde desempenham papéis importantes a nível da saúde gastrointestinal (Cocolin et al., 2007).

As bactérias do Ácido Láctico têm uma longa história de utilização na fermentação de alimentos, sendo responsáveis pelo sabor ácido em alimentos como iogurte, chucrute, pickles e alguns queijos, melhorando não só as características organolépticas dos alimentos como a sua vida útil, devido à sua capacidade de produzir moléculas com propriedades antimicrobianas como por exemplo o ácido láctico e péptidos denominados bacteriocinas (Remiger et al., 1996).

Assim a investigação sobre bacteriocinas e a sua potencial aplicação é de extrema importância, pois são moléculas extremamente versáteis e com diversas aplicações.

Este trabalho teve como objetivo o estudo de estirpes geneticamente competentes para a produção de bacteriocinas, a avaliação de condições indutoras da produção de *bacteriocine like substances* (BLIS) associadas a nutrientes disponíveis e condições ambientais, utilizando estirpes de *Lactiplantibacillus* e *Latilactobacillus*, nomeadamente, *L. plantarum*, *L. sakei* e *L. curvatus*.

Esta dissertação de mestrado é constituída primeiramente pela Revisão Bibliográfica, onde é exposta a principal informação sobre os temas estudados; Materiais e Métodos, em que é feita a descrição das metodologias aplicadas neste trabalho de modo a atingir os objetivos propostos;

Resultados e Discussão onde são apresentados os resultados obtidos, bem como a sua tendo em conta outros trabalhos, terminando com as Conclusões gerais, assim como perspectivas para trabalhos futuros.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Bactérias do ácido láctico (BAL)

As *Lactobacillales*, também conhecidas como bactérias do ácido láctico (BAL), são uma ordem de bactérias com a capacidade de produzir ácido láctico como principal ou único produto da fermentação. Esta ordem está subdividida em 5 famílias: *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae* e *Streptococcaceae*; e 25 géneros: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Weissella*, entre outros (Kant et al., 2011; Saez-Lara et al., 2015).

As BAL são geralmente cocos ou bastonetes imóveis, Gram positivas, não esporulantes e catalase-negativas. São também anaeróbias ou aerotolerantes, devido à sua capacidade de transformar o oxigénio em peróxido de hidrogénio através de flavoproteínas oxidases para além de e/ou reoxidarem o NADH produzido durante o processo fermentativo (Gobbetti et al., 2007).

Estas bactérias são quimioorganotróficas possuindo uma grande adaptabilidade metabólica especialmente a nível da fermentação dos hidratos de carbono, podendo fazer uma fermentação homoláctica ou heteroláctica.

A fermentação homoláctica é o tipo de fermentação mais usado pelas BAL, comum em *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* e *Streptococcus*. Segue a via glicolítica *Embden-Meyerhof-Parnas* (EMP) que começa na fosforilação e isomerização da molécula da glucose e termina na produção de ácido láctico, tendo um rendimento energético de 2 moléculas de ATP por molécula de glucose (figura 1).

A fermentação heteroláctica, efetuado pelas bactérias do género *Leuconostoc*, transforma a glucose (hexose) em pentose com recurso a oxidações e descarboxilações devido à ausência da enzima aldose. Contudo, apesar de seguir a via glicolítica como acontece na fermentação heteroláctica, é capaz de regenerar NAD⁺ através de NADH oxigenase e peroxidase terminando na produção de ácido láctico, CO₂, etanol e ácido acético, e um rendimento energético de 3 moléculas de ATP por molécula de glucose (figura 1) (Kandler, 1983).

No entanto, bactérias como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* são capazes de alternar de heterofermentação para homofermentação de acordo com a sua taxa de crescimento, optando pela homofermentação durante a fase exponencial de crescimento (Teusink & Molenaar, 2017).

O facto de o ácido láctico ser o ou um dos metabolitos principais destas reações permite que estas bactérias sejam tolerantes a ácidos, admitindo o seu crescimento em meios com pH baixo.

A fermentação láctica, sendo a principal via de obtenção de energia, requer que este tipo de bactérias tenha um mecanismo de neutralização da diminuição de pH, pois a produção de ácido láctico de forma descontrolada pode levar à morte celular. Estes mecanismos são induzidos pela acidificação, contudo ao atingirem valores de pH abaixo de 3,9 (pKa do ácido láctico), deixam de funcionar devido à dissociação da própria molécula (Pessione et al., 2010).

Os mecanismos de neutralização variam de espécie para espécie e vão desde um mecanismo de importação de substrato/protões, onde o ácido láctico é transformado em ácido acético, à via da arginina desaminase (ADI) e/ou à via da descarboxilação de aminoácidos, onde a acidificação

extracelular induz os operões que codificam os genes para a conversão da arginina em citrulina (na via ADI) e da lisina em cadaverina e da conversão do glutamato para ácido gama-aminobutírico (GABA) (na via da descarboxilação de aminoácidos) (Freiberg et al., 2020). Estes sistemas de neutralização da acidez são observados em diversas espécies, como por exemplo, em *Streptococcus pyogenes* onde a via ADI contribui para a produção de biofilmes (Endo et al., 2011).

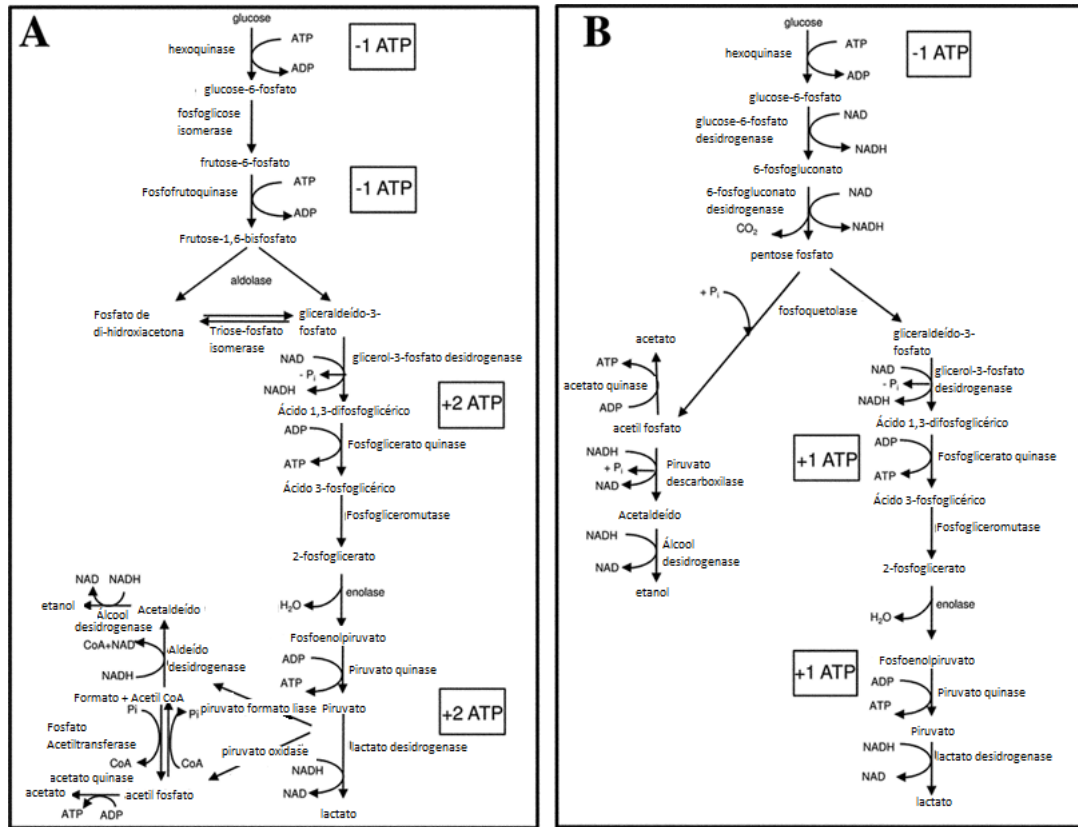


Figura 2.1 -Representação esquemática da fermentação homoláctica (A) e heteroláctica (B). (Adaptado de (Freiberg et al., 2020))

Como dito anteriormente, as BAL são dependentes de fontes de carbono, como açúcares simples (por exemplo, glucose, maltose, etc.), para o crescimento da sua população, apesar de também conseguirem metabolizar aminoácidos a partir de outras vias, como aquelas envolvidas na neutralização do pH.

Assim, as BAL são fastidiosas e restritivas, necessitando de ambientes ricos em nutrientes para proliferarem (açúcares, vitaminas e aminoácidos) como: frutas, vegetais, alimentos fermentados, trato gastrointestinal humano e animal, e conseqüentemente em esgotos devido a contaminações fecais (Adams & Moss, 2000).

Estas bactérias são conhecidas pelo seu papel significativo na fermentação de alimentos, como na produção de iogurte, chucrute, queijos, enchidos... (tabela 2.1) onde contribuem para o desenvolvimento de características organolépticas e na conservação dos alimentos através da produção de metabolitos primários como o ácido láctico e o ácido acético, e de metabolitos secundários como as bacteriocinas (péptidos que atuam contra espécies próximas ao organismo produtor). Estes metabolitos poderão ser utilizados como conservantes alimentares “naturais” e conseqüentemente serem de maior aceitação pelos consumidores (Zagorec & Champomier-Vergès, 2017). Bactérias como *L. sakei* e *L. curvatus* são conhecidas pelo seu uso comercial em culturas de arranque em

produtos cárneos (Bengtsson et al., 2016; Laranjo et al., 2017), enquanto *L. plantarum* é mais utilizada em iogurtes e queijos (Morandi et al., 2020; Toshimitsu et al., 2020).

Atualmente a maior parte da investigação sobre bacteriocinas tem sido realizada com *Lactobacillales*, devido ao seu estatuto de "generally regarded as safe" (GRAS), atribuído pela *Food and Drug Administration* (FDA) e "Qualified Presumption of Safety" (QPS), atribuído pela *European Food Safety Authority* (EFSA) (Punia Bangar et al., 2022).

Enquanto o estatuto GRAS é atribuído a qualquer aditivo alimentar, seja químico ou microbiano, que cumpra as normas estipuladas pela FDA (Agência Federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos é uma entidade Reguladora dos alimentos e medicamentos dos Estados Unidos da América) (FDA, 2023), na Europa o uso destes microrganismos é regulado pela EFSA e para serem usados a nível alimentar ou como suplemento alimentar têm de ter a qualificação de Presunção de Segurança (QPS).

De modo a ser reconhecido como um microrganismo QPS, este é avaliado rigorosamente a nível da sua identidade taxonómica. Também é feita a recolha e avaliação de toda a informação publicada sobre a espécie/estirpe em estudo e são consideradas os potenciais riscos de segurança, especialmente a nível de resistências a antimicrobianos, antimicóticos e potencial toxicogénico (EFSA, n.d.).

Este estatuto é de extrema importância tendo em conta que estas espécies para além de serem utilizados a nível alimentar são amplamente utilizadas como probióticos, devido aos seus efeitos benéficos para a saúde intestinal e sistema imunológico, promovendo o crescimento da população probiótica no ser humano. Em situações como esta a garantia de segurança para o consumo de alimentos para humano tem de estar sempre presente (Gkitsaki et al., 2024; Muñoz et al., 2012).

Considera-se um probiótico, um microrganismo vivo que confere um benefício à saúde do hospedeiro. Paralelamente estas espécies podem também ser utilizadas como pós-bióticos. Um pós-biótico é definido como um microrganismo inanimado e/ou os seus componentes que conferem um benefício à saúde do hospedeiro (ISAPP, 2023).

Para além de *L. plantarum*, estirpes como *L. rhamnosus* (Goya-Jorge et al., 2024), *L. casei* (González-Orozco et al., 2024) e *L. kefiranofaciens* (Qiao et al., 2024) são bastante utilizadas no desenvolvimento de novos probióticos, onde se confirma e evidencia as alegações que se pretendem nomeadamente o seu benefício para a saúde intestinal, minimizando a inflamação intestinal com diminuição de diarreias (Alharbi & Alateek, 2024) ou na doença de Crohn (Fedorak et al., 2015), mas também no tratamento e/ou prevenção de diversas doenças mais complexas inclusive as que tem relação com o cérebro ou outros órgãos, como Alzheimer (Xiao-hang et al., 2024), Parkinson (Jin et al., 2024), esteatose hepática (Yang et al., 2024), hipertensão (Chang et al., 2024), e até de infeções da SARS-CoV-2 (Endo et al., 2024).

Estudos recentes têm mostrados os benefícios dos pós-bióticos como anti-oxidantes (Qiao et al., 2024), anti-inflamatórios (Li et al., 2024) e até estimulantes imunitários (García-Vicente et al., 2024).

A segurança e eficácia das BAL nos seus diversos usos têm sido bem documentadas levando a uma constante investigação sobre a diversidade genómica das espécies incluídas neste grupo, elucidando sobre as suas capacidades metabólicas e potencial probiótico e pós-biótico, e aumentando

Tabela 2.1 - Bactérias Ácido Lácticas utilizadas em diversos produtos alimentares fermentados.

Aplicações Alimentares		Espécie	Referências
Produtos Lácteos	Queijo	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Lacticaseibacillus casei</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Limosilactobacillus fermentum</i> <i>Pediococcus acidilactici</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>	(Gonzalez et al., 1996; Santamarina-García et al., 2024; Todorov et al., 2017)
	Iogurte	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>	
Produtos Cárneos	Chouriço	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Latilactobacillus cuvatus</i> <i>Latilactobacillus sakei</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Levilactobacillus brevis</i> <i>Pediococcus acidilactici</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i>	(Hammes & Hertel, 1998; Hurtado et al., 2012; Khalid, 2011)
	Salsichas	<i>Lacticaseibacillus casei</i> <i>Lactiplantibacillus pentosus</i> <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> <i>Latilactobacillus cuvatus</i> <i>Latilactobacillus sakei</i> <i>Pediococcus acidilactici</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i>	

Aplicações Alimentares		Espécie	Referências
Produtos Piscícolas	Peixe Fermentado	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	(Wakil, et al., 2014)
Pickles Frutas e Vegetais	Azeitona	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i> <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> <i>Levilactobacillus brevis</i>	(Di Gioia et al., 2016; Hugas & Monfort, 1997; Kıvanç & Yapıcı, 2015; Muyanja et al., 2003; Nilchian et al., 2016; Palla et al., 2017)
	Chucrute	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Levilactobacillus brevis</i> <i>Limosilactobacillus fermentum</i>	
Kimchi	<i>Latilactobacillus sakei</i> <i>Companilactobacillus kimchii</i> <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i>		
Pepino	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i> <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Levilactobacillus brevis</i> <i>Limosilactobacillus fermentum</i>		
Produtos à Base de Cereais Fermentados	Massa Mãe	<i>Levilactobacillus brevis</i> <i>Limosilactobacillus reuteri</i> <i>Companilactobacillus alimentarius</i> <i>Companilactobacillus farciminis</i> <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus amylovorus</i> <i>Lentilactobacillus hilgardii</i> <i>Levilactobacillus brevis</i>	

a compreensão destes microrganismos benéficos aplicados em contextos tradicionais e modernos (Rizzello et al., 2006).

2.2. Géneros *Lactiplantibacillus* e *Latilactobacillus*

Até recentemente os géneros *Lactiplantibacillus* e *Latilactobacillus* estavam englobados num só género: *Lactobacillus*. Este antigo género era bastante heterogéneo e englobava um número considerável de diferentes espécies que por vezes apresentavam um baixo grau de similaridade entre si. Assim, foi importante separar este género em grupos relevantes que partilhem certas características fisiológicas e metabólicas, facilitando assim o seu estudo (Zheng et al., 2020).

Atualmente o género *Lactiplantibacillus* engloba 21 espécies, entre os quais *L. plantarum*, *L. carotarum* e *L. fabifermentans*, enquanto o género *Latilactobacillus* engloba apenas 5 espécies, como *L. curvatus*, *L. sakei* e *L. fuchuensis*.

Ao contrário de outras bactérias, *L. plantarum* é caracterizada pela ausência do gene *sod*, que codifica superóxido dismutase (SOD), uma enzima que utiliza iões de ferro e radicais superóxido para a produção de oxigénio. Assim a SOD atua como um antioxidante e permite que as bactérias se multipliquem na presença de oxigénio. *L. plantarum* ao não possuir o gene *sod*, sendo SOD negativa, consegue sobreviver e multiplicar-se em meios isentos de ferro (Elli et al., 2000). No entanto, *L. sakei* possui o gene *sod*, indicativo da necessidade de ferro para a multiplicação bacteriana em aerobiose (Duhutrel et al., 2010).

Estes géneros têm uma longa história de utilização a nível alimentar e sendo unicamente homofermentativos, fermentam uma ampla variedade de carboidratos, estando assim presentes em diversos alimentos fermentados, incluindo vegetais, carnes, laticínios e cereais (Yulin Zhang et al., 2022), muitas vezes sendo utilizadas como culturas *starter* ou de arranque.

No caso do fabrico de queijos são usados vários tipos de culturas de arranque, mas todas são uma mistura de culturas primárias e secundárias, cujos propósitos são muito diferentes. As culturas primárias têm como objetivo iniciar o processo de fermentação e acidificação com a produção de ácido láctico, enquanto as culturas secundárias são um grupo de microrganismos cujo papel são dar origem a modificações organolépticas e bioquímicas tanto no interior como no exterior dos queijos (Potes, 2000). Em Portugal, a espécie *L. plantarum* faz parte das culturas primárias dos queijos artesanais, devido à sua capacidade metabólica homofermentativa, cujo metabolito primário da fermentação é o ácido láctico (Parente & Cogan, 2004).

Já em produtos cárneos a adição de espécies como *L. curvatus* e *L. sakei* é uma prática comum nalguns países e em alguns produtos (Yulong Zhang et al., 2020), pois a sua adição permite que a massa de carne inicie uma descida rápida do pH durante os primeiros dias de fermentação, através da produção de ácido. Isto contribui para a textura e segurança do produto, evitando a proliferação de microrganismos deteriorantes e patogénicos, seja devido à presença de ácido láctico ou de outros metabolitos como bacteriocinas (Marty et al., 2012).

Estes dois géneros apresentam características genéticas semelhantes, as percentagens de Guanidina + Citosina (G + C) em *Lactiplantibacillus* e *Latilactobacillus* são de 42,9-48,7% e 40-42%, respetivamente, e os seus genomas variam entre 1,8 e 3,3 Mb (Coculescu, 2009).

Estes géneros são caracterizados pela sua resistência intrínseca aos antimicrobianos do grupo dos aminoglicosídeos (gentamicina, kanamicina, estreptomycin e neomicina), vancomicina, ciprofloxacina e trimetoprim, e são suscetíveis à penicilina e β -lactâmicos, clorofenicol, tetraciclina,

eritromicina, linezolida e quinupristina-dalfopristina. Contudo, tem sido detetada resistência adquirida à tetraciclina, eritromicina, clindamicina e cloranfenicol em lactobacilos isolados de alimentos fermentados (Kant et al., 2011). No caso das resistências intrínsecas estas são codificadas cromossomicamente e não são transferíveis.

Tabela 2.2 - Lista de antimicrobianos testados, respetiva classe e modo de atuação

Antimicrobianos	Classe	Modo de Atuação	Referências
Eritromicina	Macrolídeos	Inibe síntese proteica	(Anisimova & Yarullina, 2018)
Tetraciclina	Tetraciclinas	Inibe síntese proteica	(Chopra & Roberts, 2003)
Vancomicina	Glicopeptídeos	Inibe a síntese de peptidoglicanos da parede celular	(Duche et al., 2023)
Lincomicina	Lincosamidas	Inibe síntese proteica	(Dec et al., 2018)
Clorofenicol	Clorofenicol	Inibe síntese proteica	(Jewell & Collins-Thompson, 1989)
Quinupristina/Dalfopristina	Estreptograminas	Inibe síntese proteica	(Luh et al., 2000)
Rifampicina	Antimicobacterianos	Inibe a transcriptase de ácidos nucleicos	(Campedelli et al., 2019)
Gentamicina	Aminoglicosídeos	Inibe síntese proteica	(Zhang et al., 2017)
Penicilina G	Penicilinas	Inibe a síntese de peptidoglicanos da parede celular	(Liu et al., 2024)

Por exemplo, a vancomicina faz parte do grupo de antimicrobianos dos glicopeptídeos e tem como alvo a síntese da parede celular bacteriana ligando-se ao elemento básico da parede celular de bactérias Gram-positivas: o peptidoglicano; a partir de ligações hidrogénio com um dos componentes principais do peptidoglicano, o péptido D-alanil-D-alanina (D-Ala-D-Ala). A presença dos genes *van* em lactobacilos permite que a bactéria produza precursores do peptidoglicano que resulta na resistência intrínseca à vancomicina (Duche et al., 2023).

Tal como a vancomicina, a penicilina tem o mesmo modo de atuação (tabela 2.2), contudo a sua resistência é adquirida a partir da exposição recorrente ao antimicrobiano, que seleciona uma mutação nos genes *pbp* (*penicillin-binding proteins*). Estes genes codificam proteínas de ligação à penicilina que desempenham papéis importantes na síntese e modificação das paredes celulares bacterianas. Ao sofrerem alteração na sua síntese, devido à mutação, estas proteínas perdem a sua afinidade com o antimicrobiano adquirindo assim resistência ao mesmo (Y. Liu et al., 2024).

Outra resistência muito relatada em lactobacilos é a associada à tetraciclina (tabela 2.3). A tetraciclina atua como inibidor da síntese proteica, ligando-se à subunidade 30S do ribossoma microbiano e impedindo a formação de ligações de hidrogénio entre os aminoácidos durante a tradução do mRNA e consequentemente a formação de uma cadeia peptídica (Chopra & Roberts, 2003). Contudo, em bactérias resistentes à tetraciclina essa inibição não ocorre devido à presença dos genes *tet*, que podem codificar dois mecanismos distintos: uma bomba de efluxo, que ejeta a tetraciclina da célula, evitando a acumulação de tetraciclina no citoplasma; ou uma proteína de

proteção do ribossoma, libertando a tetraciclina da subunidade 30S do ribossoma, permitindo que a tradução continue.

Ao contrário da vancomicina em que a resistência é intrínseca aos lactobacilos, nas tetraciclinas a resistência é adquirida por transferência horizontal de genes, que pode ocorrer através de três mecanismos: por transformação, em que material genético estranho é adquirido do ambiente extracelular; por transdução, em que a bactéria é infetada por um bacteriófago contendo o DNA causando assim a transferência do material genético; ou através do processo de conjugação, em que a transferência de DNA é induzido pelo contato entre as células normalmente envolvendo elementos genéticos móveis, como plasmídeos ou transposões (Muñoz-Atienza et al., 2013).

Tabela 2.3 - Resistências a antimicrobianos e respetivos genes associados mais prevalentes em *Lactiplantibacillus* e *Latilactobacillus* presentes em produtos alimentares, na literatura.

Antimicrobiano	Genes	Espécie	Referências
Ciprofloxacina	<i>par(C)</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	(Liu et al., 2009)
Clorofenicol	<i>cat</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	(Campedelli et al., 2019)
Eritromicina	<i>ere(A)</i> <i>erm(B)</i> <i>erm(C)</i> <i>mef(A)</i> <i>erm(B)</i> <i>erm(B)</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> <i>Latilactobacillus curvatus</i> <i>Latilactobacillus sakei</i>	(Ammor et al., 2008; El Issaoui et al., 2021; Feld et al., 2008; Liu et al., 2009; Rao Thumu & Halami, 2012; Zonenschain et al., 2009)
Gentamicina	<i>AMT(6)</i> <i>aad(E)</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	(Campedelli et al., 2019) (Liu et al., 2009)
Tetraciclina	<i>tet(M)</i> <i>tet(S)</i> <i>tet(W)</i> <i>tet(L)</i> <i>tet(M)</i> <i>tet(W)</i> <i>tet(M)</i> <i>tet(W)</i> <i>tet(L)</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> <i>Latilactobacillus curvatus</i> <i>Latilactobacillus sakei</i>	(Aquilanti et al., 2016; Feld et al., 2008; C. Liu et al., 2009; Rao Thumu & Halami, 2012; Zago et al., 2011)
Vancomicina	<i>Ddl F-type</i> <i>van(X)</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	(Campedelli et al., 2019) (C. Liu et al., 2009; Zago et al., 2011)

Outra resistência adquirida pouco comum, mas reportada em *Lactiplantibacillus* e *Latilactobacillus*, é da rifampicina. Este antimicrobiano atua inibindo a transcrição ao ligar-se à subunidade β da RNA polimerase. As bactérias que exibam resistência à rifampicina, apresentam mutações

no gene *rpoB*, codificante da subunidade β da RNA polimerase, que resulta numa menor afinidade à rifampicina por parte da RNA polimerase (Campedelli et al., 2019).

Como dito anteriormente os lactobacilos são vulneráveis à troca de material genético. Isto não acontece só com genes de resistência a antimicrobianos, mas também com fatores de virulência.

Os fatores de virulência são genes e moléculas produzidas por microrganismos patógenos que aumentam sua capacidade de causar doenças (Korves & Colosimo, 2009). Uma característica destes genes de fatores de virulência é que a interrupção da sua expressão reduz o potencial patogénico sem influenciar a viabilidade ou fitness, e a reativação do fator de virulência restaura o potencial patogénico da bactéria (Muñoz-Atienza et al., 2013). Estes fatores podem estar codificados no DNA cromossómico e bacteriófago, plasmídeos ou transposões, permitindo assim sua aquisição a partir de elementos genéticos móveis (Kreibich & Hardt, 2015).

Nos géneros *Lactiplantibacillus* e *Latilactobacillus*, nomeadamente *L.plantarum*, *L.curvatus* e *L.sakei*, a presença de fatores de virulência é muito baixa, mas existente (Rossi et al., 2019). Não sendo estas espécies naturalmente patogénicas, a presença destes genes ocorre maioritariamente por troca de material genético com outras espécies de BAL (Svetoslav Dimitrov Todorov, Perin, et al., 2017), como *E. faecium* (Rossi et al., 2019) ou *L.casei* (Colombo et al., 2020).

2.3. Bacteriocinas

Bacteriocinas são pequenos péptidos ou complexos proteicos (30 a 60 aminoácidos) produzidos por diversas bactérias como um mecanismo de imunidade específico. São sintetizados a nível do ribossoma e libertados para o meio extra ou intracelular apresentando um efeito bactericida ou bacteriostático contra microrganismos competidores, normalmente taxonomicamente semelhantes ao microrganismo produtor. Este mecanismo de defesa natural é utilizado pelas bactérias para competir pelos recursos do seu ambiente, especialmente em ecossistemas densamente povoados, sendo por isso ativado perante situações de stress celular ou metabólico (Wang et al., 2024).

O stress metabólico, induzido pelo meio de cultura, é o método mais usado para a produção de bacteriocinas. É sabido que o ambiente de crescimento tem uma grande influência na produção e atividade enzimática das bacteriocinas e que cada espécie apresenta uma necessidade nutricional e ambiental diferente. A disponibilidade de nutrientes, temperatura, pH, são fatores cruciais (tabela 4) durante a produção de bacteriocinas. A utilização de meios de cultura ricos em fontes de carbono e nitrogénio tem provado ser eficaz na produção de bacteriocinas, nomeadamente glucose, extrato de levedura, extrato de carne e triptona. Outro suplemento que tem apresentado bons resultados é a adição de vitamina B aos meios de cultura onde (Svetoslav D. Todorov & Dicks, 2007) se conseguiu uma atividade inibitória máxima de 25600AU/mL em meio *Man Rogosa Sharpe* (MRS) suplementado com vitamina B₁. O crescimento da população microbiana em ambiente de competição, ou seja, a bactéria é incubada com um agente patogénico (mais comum é o uso de *Listeria monocytogenes* para o efeito) é um método que tem provado bons resultados. O ambiente competitivo cria imediatamente uma situação de stress que faz com que a bactéria produza bacteriocinas com elevada atividade inibitória.

As bacteriocinas estão divididas em 4 classes:

Classe I: As bacteriocinas de classe I são tipicamente peptídeos pequenos e estáveis ao calor, com pesos moleculares variando de 2 a 5 kDa. Distinguem-se pela presença de aminoácidos incomuns,

como a lantionina e a beta-metil-lantionina, introduzidos através de modificações pós-traducionais. Esta classe de bacteriocinas têm como alvo principal as membranas celulares de bactérias suscetíveis. Atuam ao ligar-se a um precursor da membrana célula e interferem na integridade da membrana, levando à lise e morte celular.

Classe II: As bacteriocinas de classe II são tipicamente peptídeos pequenos e estáveis ao calor, variando de 2 a 10 kDa em tamanho. Apresentam frequentemente um amplo espectro de atividade antimicrobiana, tendo como alvo várias bactérias Gram-positivas, incluindo estirpes estreitamente relacionadas. As bacteriocinas de classe II são geralmente catiónicas e anfifílicas, o que contribui para suas propriedades antimicrobianas. As bacteriocinas de classe II normalmente têm como alvo a membrana celular de bactérias suscetíveis. Eles podem criar poros ou perturbar a integridade da membrana, levando à lise e morte celular. Algumas subclasses comuns incluem Classe IIa (semelhante à pediocina), Classe IIb (dois peptídeos), Classe IIc (cíclica) e Classe II d (linear não modificada).

Classe III: As bacteriocinas de classe III são tipicamente maiores que outras classes, com pesos moleculares variando de 30 a 60 kDa. São estáveis ao calor e podem suportar temperaturas elevadas, o que os torna adequados para diversas aplicações de processamento de alimentos. Estas bacteriocinas exibem frequentemente atividade antimicrobiana de amplo espectro, visando uma ampla gama de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. As bacteriocinas de classe III normalmente possuem estruturas complexas e mecanismos de ação multifacetados. Eles podem perturbar a integridade da membrana celular alvo, levando à morte celular pois têm a capacidade de formar poros ou canais na membrana celular, o que perturba o equilíbrio iônico e processos celulares essenciais.

Classe IV: As bacteriocinas de classe IV são relativamente menos caracterizadas em comparação com outras classes de bacteriocinas. Abrangem um grupo diversificado de peptídeos antimicrobianos com estruturas e modos de ação variados, como a macedocina produzida por *Streptococcus macedonicus* e amilovorina produzida por *Lactobacillus amylovorus*. Os mecanismos de ação desta bacteriocinas variaram amplamente, desde atingir a membrana celular, interferir na síntese de DNA ou de proteínas ou interromper processos celulares em bactérias-alvo (Gillor et al., 2008; Todorov, 2009).

Atualmente estão registradas em base de dados 177 bacteriocinas (Bactibase), contudo, apesar de maior parte estar associadas a bactérias Gram-positivas, a sua produção não é exclusiva a este tipo de microrganismos. Bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli* produzem bacteriocinas cuja classificação é feita por peso molecular: microcinas, de baixo peso molecular; colicinas, induzidas por um sistema de SOS celular; e tailocinas, com uma morfologia semelhante às caudas de bacteriófagos (Gálvez et al., 2007)

Tabela 2.4 - Condições ótimas de crescimento da população bacteriana para produção de bacteriocinas. (*-Crescimento foi realizado em ambiente de competição com *Listeria monocytogenes*)

Espécie	Bacteriocina	Suplementos Adicionado ao Meio MRS	pH	Temperatura (°C)	Referências
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> SLG10	Bacteriocina SLG10	MRS	-	37	(Pei et al., 2020)
<i>Latilactobacillus sakei</i> CCUG 42687	Sakacina P	Glucose <40 g/L Extrato Levedura 10 g/L	6,0 a 6,3	20	(Aasen et al., 2000)
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i> ST712BZ	Bacteriocina ST712BZ	Triptona 20 g/L Triptona 12,5 g/L + Extrato Levedura 7,5 g/L Triptona 10 g/L + Extrato Levedura 5 g/L + Extrato Carne 5 g/L Glucose 20g/L Tiamina (Vit. B1) 1 mg/L	3,8 3,7 3,8 3,7 4,0	30	(Todorov & Dicks, 2007)
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ST13BR	Bacteriocina ST13BR	Fosfato monopotássico 2,0 g/L Maltose 20 g/L e 30 g/L Triptona 12,5 g/L + Extrato Levedura 7,5 g/L Triptona 12,5 g/L + Extrato Carne 7,5 g/L Extrato Levedura 7,5 g/L+ Extrato Carne 7,5 g/L	6,5	30	(Todorov et al., 2004)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> KS400	Bacteriocina KS400	MRS + 10% CO ₂	6,5	30	(Gaspar et al., 2018)
<i>Latilactobacillus curvatus</i> 54M16	Sakacina X Sakacina T Sakacina P	*MRS	-	30	(Casaburi et al., 2016)
<i>Latilactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> 2a	Bacteriocina L. sakei 2a	Glucose 3,25 a 6,0 g/L Tween20 0.575 a 1.15 %(v/v)	5,5 a 7,0	25 a 30	(Malheiros et al., 2015)
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> B21	Plantaricina B21AG	Extrato Carne 25 g/L Extrato Levedura 25 g/L Lactose 20 g/L Maltose 20 g/L Glucose 10 a 30 g/L	3,6 a 4,0	30 e 37	(Parlindungan et al., 2021)

2.4. Plantaricina e sakacina

A plantaricina é um tipo de bacteriocina de Classe II produzida especificamente por estirpes de *Lactiplantibacillus plantarum*, produzida pelos genes *pln*. Para além da nisina, a plantaricina é uma das bacteriocinas mais estudadas a nível de mecanismo de ação e potencial uso tecnológico.

A sakacina é também uma bacteriocina de Classe II, produzida pelos genes *sak*, contudo para além de ser produzida por estirpes como *Latilactobacillus sakei* e *Latilactobacillus curvatus*, é também produzida por certas estirpes de *Listeria monocytogenes*, estando assim sujeito a regulamentação estrita devido aos riscos potenciais à saúde associados à *Listeria monocytogenes* (Rivas et al., 2018; Wang et al., 2024).

Ambas são caracterizadas pelo seu tamanho molecular relativamente pequeno (normalmente inferior a 10 kDa) e sua capacidade de atingir uma vasta gama de bactérias Gram-positivas, incluindo estirpes estreitamente relacionadas e certas bactérias patogénicas como *Listeria monocytogenes* (Gao et al., 2011). Como todas as bacteriocinas de classe II, atuam ao comprometer a integridade da membrana celular alvo, criando poros na membrana e consequentemente, causando a lise e morte celular das bactérias-alvo (Todorov, 2009). (Gonzalez et al., 1996) refere que a plantaricina C tem como principal alvo a membrana plasmática e atua formando poros que permite a troca de solutos entre o citoplasma e ambiente exterior. Após a lise celular a síntese de macromoléculas termina imediatamente e existe a libertação da uridina acumulada no citoplasma das células alvo.

Como outras bacteriocinas de Classe II, a plantaricina e a sakacina são de particular interesse na indústria alimentar devido à sua estabilidade a altas temperaturas, ausência de sabor, resistência a pH ácido e atividade antimicrobiana de amplo espectro, como é possível observar pela tabela 2.5 (Garsa et al., 2014).

Tanto a sakacina como a plantaricina, apresentam estabilidade térmica a temperaturas superiores a 100°C e tolerância a uma grande variância de pH (2,0 a 10), características que permitem a sua utilização destas proteínas na área alimentar, seja no fabrico de produtos ou no acondicionamento dos mesmos (Kareem & Razavi, 2020). A sua eficácia como um antimicrobiano, em microrganismos como *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, tem sido muito relatada na literatura.

Assim, estes tipos de moléculas representam uma alternativa eficaz como um antimicrobiano, sem o risco das resistências que os antimicrobianos “tradicionais” apresentam, um dos maiores problemas atuais da sociedade moderna.

Tabela 2.5 - Caracterização de plantaricinas e sakacinas de acordo com a sua estabilidade térmica, pH, sensibilidade enzimática e atividade antimicrobiana.

Bacteriocina	Estabilidade Térmica	pH	Sensibilidade Enzimática	Estirpes Sensíveis	Referências
Plantaricina DL3	15 min, 121 °C	2,5 a 5,5	Inibição após tratamento com pepsina, tripsina e papaína	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Shewanella putrefaciens</i> <i>Psychrobacter sp.</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	(Lv et al., 2018)
Plantaricina ZJ008	30 min, 121 °C	4,0 a 5,0	Sensibilidade a quimotripsina, tripsina, papaína e pepsina. Apresenta 80% de atividade após tratamento com proteinase K	<i>Streptomyces citreus</i> <i>Micrococcus luteus</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>E. coli</i> <i>Shigella flexineri</i> <i>Vibrio</i> <i>Parahaemolyticus</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Song et al., 2014)
Plantaricina K25	121 °C	2,0 a 8,0	Inativação parcial a proteinase e pronase e degradação completa por peptidase e tripsina	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 <i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 10890	(Kaya & Simsek, 2019)

Bacteriocina	Estabilidade Térmica	pH	Sensibilidade Enzimática	Estirpes Sensíveis	Referências
Sakacina ZFM225	30 min, 100 °C	8,0 a 10,0	Inativação após tratamento com tripsina e pepsina	<i>Micrococcus luteus</i> CICC 10209 <i>Staphylococcus aureus</i> D48 <i>Listeria monocytogenes</i> LM1	(Shentu et al., 2023)
Sakacina B	20 min, 100°C	2,0 a 9,0	Degradação completa por protease e bromelaína	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	(Samelis et al., 1994)

2.5. Uso tecnológico das bacteriocinas

Devido às suas propriedades antimicrobianas e especificidade contra certas estirpes, as bacteriocinas tem diversas potenciais aplicações tecnológicas reduzindo a dependência dos aditivos conservantes e enfrentando os desafios da resistência aos antibióticos em vários setores (tabela 2.6).

Tabela 2.6 - Aplicações tecnológicas das bacteriocinas em diversos ramos.

Bacteriocinas	Aplicação Tecnológica	Referências
Nisina	Área Alimentar	Desenvolvimento de uma película antimicrobiana para embalagens de produtos alimentares (Kirtonia et al., 2021)
Sakacina	Área Alimentar	Conservante alimentar de produtos cárneos fumados (Callewaert et al., 2000; Jofré et al., 2006)
Plantaricina 827	Área Alimentar	Inibe <i>Staphylococcus aureus</i> e prolonga a <i>shelf life</i> do leite (Zhao et al., 2022)
Enterocina A	Área Alimentar	Conservante alimentar em produtos lácticos, vegetais e cárneos (Kirtonia et al., 2021)
Curvicina A	Área Alimentar	Conservante alimentar de produtos cárneos fumados (Verluyten et al., 2004)
Bacteriocina BA28	Medicina	Tratamento de úlceras pépticas causadas por <i>Helicobacter pylori</i> (Kaur et al., 2014)
Fermenticina HV6b	Medicina	Tratamento de infecções vaginais causadas por <i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>Mobiluncus</i> , <i>Staphylococci</i> , e <i>Streptococci</i> (Kaur et al., 2013)
Nisina ZP	Medicina	Estudo e desenvolvimento da bacteriocina como um possível anti-tumoral (Kamarajan et al., 2015)
Lacticina 3147	Veterinária	Tratamento para mastitis em vacas (Crispie et al., 2004)

Atualmente, a nisina é das bacteriocinas mais utilizadas a nível alimentar e medicinal. É uma das poucas bacteriocinas reconhecidas como GRAS e assim permitido o seu uso a nível comercial. Devido às suas propriedades antimicrobianas é muito utilizada na indústria alimentar servindo como conservantes naturais, permitindo prolongar a vida útil e melhorar a segurança dos produtos alimentícios (Lv et al., 2018).

A plantaricina, sakacina, enterocina são mais utilizadas a nível alimentar sendo diretamente adicionadas ao produto ou utilizando a estirpe produtora no desenvolvimento do produto (Kirtonia et al., 2021). Estas bacteriocinas são muito eficazes na inibição do crescimento de microrganismos deteriorantes e agentes patogénicos de origem alimentar, como *Staphylococcus aureus* (Zhao et al., 2022).

Já a nível medicinal, estão a ser desenvolvidos novos métodos de combater agentes patogénicos, muitas vezes utilizando bacteriocinas previamente estudadas e purificadas, como a fermenticina

(Kaur et al., 2013), ou utilizando a estirpe produtora e aproveitando todo o potencial bacteriocinogénico que ela oferece, sem purificar e identificar as moléculas em questão (Kaur et al., 2014).

Assim as bacteriocinas apresentam uma versatilidade de usos, sendo imprescindível o seu estudo e desenvolvimento contínuo.

3. Otimização da capacidade de produção de bacteriocinas por estirpes de *Lactiplantibacillus* e *Latilactobacillus*

3.1. Objetivos

Este trabalho teve como principais objetivos: i) Analisar a presença de genes que codifiquem a produção de bacteriocinas em *Lactiplantibacillus* e *Latilactobacillus*; ii) avaliar a resposta celular (nomeadamente, crescimento, produção de ácido láctico e produção de *bacteriocin like substances* (BLIS)) em espécies do género *Lactiplantibacillus* e *Latilactobacillus* (*L. plantarum*, *L. sakei* e *L. curvatus*) perante stress metabólico induzido através de fatores nutricionais e ambientais iii) otimização da produção de BLIS, a partir da indução de stress metabólico, assim como a sua semi-purificação.

4. Materiais e métodos

4.1. Estirpes microbianas

4.1.1. Origem das estirpes

Neste trabalho foram usadas oito estirpes de espécies pertencentes aos géneros *Lactiplantibacillus* e *Latilactobacillus* (tabela 4.1) previamente identificadas como possíveis produtoras de bacteriocinas, nomeadamente *L. plantarum*, *L. sakei* e *L. curvatus* da coleção de isolados do Laboratório de Tecnologia Alimentar, Departamento de Produção Animal e Segurança Alimentar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa.

Tabela 4.1- Estirpes de trabalho utilizadas neste estudo

Nome Estirpe	Espécie
S3M3	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
L1B8	<i>Latilactobacillus sakei</i>
P05-45	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
P3B7	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
P3B8	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
2L2-4	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
P2B3	<i>Latilactobacillus sakei</i>
L2B3	<i>Latilactobacillus curvatus</i>

4.1.2. Cultura e isolamento das estirpes

As estirpes em estudo, provenientes de produtos cárneos tradicionais curados encontravam-se conservadas em criotubo de *Brain Hearth Infusion* (BHI) (Scharlab, Espanha) com 10% de glicerol e congeladas a -80°C. Foram revificadas por cultura em caldo *Man Rogosa Sharpe* (MRS, Scharlab, Espanha) a 30°C durante 48 horas e sub cultivadas em meio sólido *Man Rogosa Sharpe* (MRS, Scharlab, Espanha) suplementado com 2-3-5 trifetil de tretrazólio a 1% (Thermo Fisher Scientific, EUA), e acetato de tálio a 5% (Sigma-Aldrich, EUA), tendo sido incubadas a 30°C, durante 48 horas em jarra de anaerobiose (Merck, Alemanha). As estirpes foram posteriormente cultivadas overnight em caldo *Man Rogosa Sharpe* (MRS) (Scharlab, Espanha), estando assim preparadas para os diversos métodos descritos adiante.

4.2. Caracterização genótipica e fenótipica

4.2.1. Extração e quantificação de DNA genómico

Para a extração do DNA genómico foi utilizado o método descrito por (Talon et al., 2007) com recurso à resina Chelex 100 (Merk, Alemanha), uma resina quelante de troca iónica que provoca a lise celular. Foi retirado um mL de inóculo em caldo *Man Rogosa Sharpe* (MRS, Scharlab, Espanha), incubado overnight a 30°C, o qual foi centrifugado (Centrifuge 5415R, Eppendorf AG, Alemanha) a 12 000 rpm durante 5 min a 4°C e removido o sobrenadante. Ao *pellet* foi adicionado 300 µL de solução Chelex a 6% e homogeneizou-se a solução no vortex. Seguidamente a solução foi colocada em banho seco a 100°C durante 8 min e imediatamente em gelo durante cerca de 2 min, recorrendo-se assim à lise celular por métodos físicos, nomeadamente mecânico e térmico. Finalmente a solução foi novamente centrifugada a 12 000 rpm durante 5 min a 4°C e transferiu-se 80 µL do extrato para um novo tubo.

Os extratos foram quantificados e foi avaliada a sua pureza com recurso ao equipamento NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, EUA), sendo posteriormente otimizados para concentrações de 100 a 150 ng/µL.

4.2.2. Detecção e identificação de genes codificantes de bacteriocinas

Com o objetivo de detetar e identificar os genes codificantes das bacteriocinas plantaricinas e sakacinas, recorreu-se à técnica de PCR. Foram utilizados 2 primers para cada gene (*Forward* e *Reverse*) tendo sido estudados no total 10 genes para *L. plantarum* e 3 genes para *L. sakei* e *L. curvatus* utilizando um método adaptado de (Cocolin et al., 2007), para as plantaricinas, e (Remiger et al., 1996) para as sakacinas (tabela 4.2 e 4.3).

A reação de PCR foi realizada num volume total de 25 µl utilizando-se 2,5 µl de Tampão 1x (10x Reaction Buffer), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de mix dNTP's (dNTP set 100 mM Nzytech, Portugal), 10 pmol/µl de cada primer e 0,5 U/µl de Taq Polimerase (NzyTaq DNA Polimerase). A amplificação foi realizada no termociclador VWR Dpio (VRW, Bélgica).

Como controlo positivo foram utilizadas as estirpes de referência *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC® BAA 793 (para as plantaricinas) e *Latilactobacillus curvatus* ATCC® 51436 (para as sakacinas).

Tabela 4.2 - Primers e condições utilizados na reação de PCR para a detecção de genes produtores de Plantaricinas amplificados por PCR

	Denominação do Primer	Sequência do Primer (5'→3')	Amplicons (pb)	Temperatura de annealing (°C)
PlnA	PlnA-F	GTA CAG TAC TAA TGG GAG	450	53,5
	PlnA-R	CTT ACG CCA TCT ATA CG		
PlnB	PlnB-F	GCT TCT TAT TTA AGT AGA GGA	927	53,5
	PlnB-R	GCC ACG ATT ACT ACC CTT AG		
PlnC	PlnC-F	AGC AGA TGA AAT TCG GCA G	108	53,5
	PlnC-R	ATA ATC CAA CGG TGC AAT CC		
PlnK	PlnK-F	CTG TAA GCA TCG CTA ACC AAT	246	53,5
	PlnK-R	ACT GCT GAC GCT GAA AAG		
PlnN	PlnN-F	ATT GCC GGG TTA GGT ATC G	146	53,5
	PlnN-R	CCT AAA CCA TGC CAT GCA C		
PlnR	PlnR-F	CCC AGC AGT CCC ATC ACT AA	236	56,5
	PlnR-R	TTA CGG AGC GGC ATC TAT		
PlnL	PlnL-F	ACG GCG TCT GAG ATC CAA TG	413	56,5
	PlnL-R	GTT CTG GAA GTC ACT GCG		
PlnJ	PlnJ-F	TAA CGA CGG ATT GCT CTG	475	53,5
	PlnJ-R	AAT CAA GGA ATT ATC ACA TTA		
PlnM	PlnM-F	AAG CGG TAT ATT AAA AGC GTA	444	54
	PlnM-R	CAT TTC CTC CTT AAA GCA TTC		
PlnD	PlnD-F	TGA GGA CAA ACA GAC TGG AC	414	54
	PlnD-R	GCA TCG GAA AAA TTG CGG		

Tabela 4.3 - Primers e condições utilizados na reação de PCR para a detecção de genes produtores de Sakacinas amplificados por PCR

	Denominação do Primer	Sequência do Primer (5'→3')	Amplicons (pb)	Temperatura de annealing (°C)
SakA	SakA-F	GTA AAA GAA TTA AGT ATG	171	50
	SakA-R	TTA CAT TCC AGC TAA ACC		
SakP	SakP-F	ATG GAA AAG TTT ATT GAA	200	47
	SakP-R	TTA TTT ATT CCA GCC AGC		
SakQ	SakQ-F	ATG CAA AAT ACA AAA GAA	200	49
	SakQ-R	CGC TTG TTT AGA GAC ACC		

Os produtos de PCR foram separados por electroforese em gel de agarose (Lonza, EUA) a 1,5% (p/v) em tampão Tris-borato-EDTA (TBE) (0,89 M Tris, 0,89 M ácido bórico, 20 mM EDTA-Na₂) (AppliChem, Alemanha) a uma voltagem constante de 100 V durante 90 min. O gel foi corado com GelRed® (Biotium, EUA) e o NZYDNA Ladder III (NZYtech, Portugal) foi utilizado como marcador de peso molecular, com uma escala que varia de 100 a 1000 pares de bases.

4.2.3. Teste de suscetibilidade a antimicrobianos

A suscetibilidade aos antibióticos foi avaliada utilizando o método de difusão em disco, em meio *Mueller Hinton* (Scharlab, Espanha). Testou-se a suscetibilidade a oito antimicrobianos, indicados com as respetivas concentrações: Eritromicina 15 µg, Tetraciclina 30 µg, Vancomicina 30 µg, Rifampicina 5 µg, Gentamicina 10 µg, Lincomicina 10 µg, Clorofenicol 30 µg, Penicilina G 10 UI, Quinopristina/Dalfopristina 15 µg (Oxoid, Reino Unido). As estirpes em teste foram cultivadas *overnight* em caldo *Man Rogosa Sharpe* (MRS) (Scharlab, Espanha) e acertadas a uma concentração McFarland de 0,5. Após colocação dos discos as placas foram incubadas em jarra de anaerobiose (Merck, Alemanha) durante 24h a 30°C. Foi feita uma avaliação pelo método de difusão em disco, com *breakpoints* de resistência previamente estabelecidos pelo EUCAST

(European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), 2022) e pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2023) (tabela 4.4) em que os diâmetros dos halos de inibição foram medidos e os estirpes foram registados como sensíveis, intermédios ou resistentes a cada antimicrobiano. Para efetuar o controlo de qualidade do teste foram utilizadas as estirpes de referência *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, tal como indicado pelo EUCAST. Este teste foi realizado em duplicado para cada estirpe.

Tabela 4.4 - Breakpoints de resistência estabelecidos pelo EUCAST 2022 e CLSI 2023, com os respetivos diâmetros de inibição (mm) e designação (S - Sensível, I - Intermédio, R - Resistente).

Antimicrobianos		S	I	R
E 15µg	Eritromicina 15µg	≥23	14-22	≤13
TE 30µg	Tetraciclina 30µg	≥19	15-18	≤14
VA 30µg	Vancomicina 30µg	>15	-	≤15
MY 15µg	Lincomicina 15µg	≥21	15-20	≤14
C 30µg	Clorofenicol 30µg	≥18	17-13	≤12
QD 15µg	Quinupristina/Dalfopristina 15µg	≥21	-	≤21
RD 5µg	Rifampicina 5µg	≥20	17-19	≤16
CN 10µg	Gentamicina 10µg	≥18	14-17	≤13
P 10UI	Penicilina G 10UI	≥29	-	≤28

4.2.4. Avaliação do potencial bacteriocinogénico

Este teste permite averiguar se existe uma potencial capacidade inibitória de *Enterococcus avium* e *Listeria monocytogenes* 4A CECT 93 por parte das estirpes em teste (tabela 1) e se essa inibição é de natureza proteica, indicativa de eventual produção de bacteriocinas.

Numa placa de meio *Man Rogosa Sharpe* (MRS) (Scharlab, Espanha) foi cultivado um inoculo das estirpes em teste da colecção FMV e do controlo positivo produtor de bacteriocinas, com um risco de cerca 5 cm no centro da placa que foi incubada a 30°C em jarra de anaerobiose (Merck, Alemanha) durante 24 horas. As estirpes em teste foram cultivadas previamente em caldo *Man Rogosa Sharpe* (MRS) (Scharlab, Espanha), incubado *overnight* a 30°C, com uma densidade ótica de $0,85 \pm 0,05$ a uma absorvância de 620 nm.

Seguidamente verteu-se cerca de 6 mL de agar *Brain Hearth Infusion* (BHI) 0,7% semi-sólido (Scharlab, Espanha), previamente inoculado com 300 µL de uma estirpe sensível a bacteriocinas e *Listeria monocytogenes* 4A, incubadas *overnight* a 30°C com uma densidade ótica de $0,85 \pm 0,05$ a uma absorvância de 620 nm. A placa foi incubada a 37°C durante 24 horas.

Paralelamente foi feita uma variante deste método onde após o agar *Brain Hearth Infusion* (BHI) semi-sólido (Scharlab, Espanha) ter solidificado foi feito um poço ao lado do risco do inóculo produtor de bacteriocinas e colocado 15 µL de Proteinase K, a uma concentração de 1 mg/mL. Foram utilizados como estirpe sensível a bacteriocinas *Enterococcus avium* (EA5), isolada no LAM- IAP SAS (Kosice, Eslováquia, generosamente cedida por Andrea Laukova) e *Listeria monocytogenes* 4A CECT 934. Como controlo positivo foi utilizada a estirpe *Enterococcus faecium* (EK13), produtor de Enterocina A, isolado no LAM- IAP SAS (Kosice, Eslováquia,

generosamente cedida por Andrea Laukova). Os halos de inibição foram registados em mm e o teste foi realizado em duplicado.

4.3. Estudo da evolução da população microbiana das estirpes

4.3.1. Padronização do inóculo

De modo a garantir que foi usada a mesma quantidade de cfu/mL do inóculo inicial das diferentes estirpes em estudo, foi feita a sua padronização.

Ao inóculo bacteriano em caldo *Man Rogosa Sharpe* (MRS) (Scharlab, Espanha), incubado overnight a 30°C, com uma densidade ótica de $0,85 \pm 0,05$ a uma absorvância de 620 nm foi realizada uma diluição de acordo com a norma ISO 7218:2007 (*Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations*) para posterior contagem de cfu/mL de inóculo. Foram efetuadas diluições sucessivas (até 10^{-9}) do inóculo em Triptona Sal (Thermo Fisher Scientific, EUA). Foi plaqueado 1 mL de cada diluição por incorporação em meio *Man Rogosa Sharpe* (MRS) (Scharlab, Espanha) com incubação a 30°C durante 48^aC. Efetuou-se a contagem de colónias nas diluições semeadas.

A média ponderada foi calculada como descrito em ISO 7218:2017:

$$\frac{\sum c}{v(n_1 + 0,1n_2)d} = \text{cfu/mL}$$

Em que:

Σc - Somatório da contagem de colónias

v- Volume de inóculo

n_1 - Número de replicados da primeira diluição

n_2 - Número de replicados da segunda diluição

d- Primeira diluição considerada

4.3.2. Avaliação da taxa de crescimento populacional das estirpes em estudo em função de diferentes temperaturas

O inóculo bacteriano em caldo *Man Rogosa Sharpe* (MRS) (Scharlab, Espanha), incubado overnight a 30°C, com uma densidade ótica de $0,85 \pm 0,05$ a uma absorvância de 620 nm, foi incubado em microplaca em caldo *Man Rogosa Sharpe* (MRS) (Scharlab, Espanha) a 10% (v/v) a pH de $6,3 \pm 0,1$. A evolução do crescimento populacional da estirpe foi acompanhada no leitor de microplacas de absorvância SunriseTM (Tecan, Suíça) a 620 nm em ciclos de 30 min durante 72 h, a $30,0 \pm 0,3$ °C e a $20,0 \pm 0,3$ °C.

A recolha dos dados foi feita a partir do software XFlour4 (Tecan, Suíça). Foram feitas as curvas de crescimento nas duas temperaturas para todas as estirpes e calculadas as taxas de replicação de acordo com a fórmula:

$$g(h) = \frac{0,693}{\mu}$$

Em que:

g - Tempo de geração

μ - Taxa específica de crescimento

A taxa específica de crescimento foi obtida através da regressão linear da fase exponencial da curva de crescimento.

4.4. Avaliação da potencial produção de bacteriocinas em função dos fatores nutricionais e ambientais.

4.4.1.Preparação dos caldos MRS modificados

Para a produção de bacteriocinas foram preparados 4 caldos MRS modificados: MRS com extrato de carne 15 g/L, MRS com extrato de carne 20 g/L, MRS suplementado com vitamina B e MRS suplementado com Ferro.

Para todos estes caldos foi preparado uma base de caldo *Man Rogosa Sharpe* (MRS) (Scharlab, Espanha) normal seguindo as instruções do fabricante. Para os caldos suplementados com extrato de carne foi adicionado extrato de carne (Scharlab, Espanha) até às concentrações desejadas (15 g/L e 20 g/L). No caldo suplementado com Vitamina B foi adicionado o suplemento vitamínico Neurobion (Merck, Alemanha) a um caldo MRS normal a uma concentração de 0,003 mg/mL. No caldo suplementado com Ferro foi adicionado o suplemento vitamínico Ferrovit (DFV, Espanha) a um caldo MRS normal a uma concentração de 0,02 mg/mL.

Estes caldos suplementados foram selecionados devido aos resultados promissores apresentados noutros estudos com as mesmas espécies (tabela 2.4).

4.4.2.Avaliação da potencial produção de bacteriocinas em função dos fatores nutricionais e ambientais.

O inóculo bacteriano utilizado foi incubado *overnight* a 30°C em caldo *Man Rogosa Sharpe* (MRS) (Scharlab, Espanha), e padronizado a uma densidade ótica de $0,85 \pm 0,05$ a uma absorvância de 620 nm. O inóculo padronizado foi então incubado em microplaca em caldo *Man Rogosa Sharpe* (MRS) (Scharlab, Espanha) a 10% (v/v).

Todos os meios utilizados foram padronizados a um pH inicial de $6,3 \pm 0,1$ e $5,8 \pm 0,1$ de modo a estudar a influência do pH na produção de bacteriocinas (tabela 4.5). A recolha dos dados foi feita a partir do software XFlour4 (Tecan, Suíça). Durante a incubação foram retiradas amostras

das estirpes e registado o pH das mesmas, através de tiras de análise de pH (Johnson Test Papers, Reino Unido) (t=7h, t=8h, t=9h, t=10h, t=11h, t=12h, t=13h, t=14h, t=15h, t=24h, t=48h, t=72h).

As absorvâncias foram registadas a 620 nm em ciclos de 30 min durante 72 h, a $30,0 \pm 0,3$ °C e a $20,0 \pm 0,3$ °C.

Tabela 4.5 - Condições testadas na avaliação da potencial produção de bacteriocinas em função dos fatores nutricionais, temperatura e pH.

Substrato	pH inicial	Temperatura (°C)
MRS com extrato de carne 15 g/L		
MRS com extrato de carne 20 g/L		
MRS suplementado com Vitamina B	5,8	
MRS suplementado com Ferro		
MRS		
		30
MRS com extrato de carne 15 g/L		
MRS com extrato de carne 20 g/L		
MRS suplementado com Vitamina B	6,3	
MRS suplementado com Ferro		
MRS		
		20
MRS com extrato de carne 15 g/L		
MRS com extrato de carne 20 g/L		
MRS suplementado com Vitamina B	5,8	
MRS suplementado com Ferro		
MRS		
MRS com extrato de carne 15 g/L		
MRS com extrato de carne 20 g/L		
MRS suplementado com Vitamina B	6,3	
MRS suplementado com Ferro		
MRS		

Como meio de controlo foi utilizado o caldo *Man Rogosa Sharpe* (MRS) (Scharlab, Espanha) normal, preparado segundo as instruções do fabricante. Como controlo positivo foi utilizada a estirpe *Enterococcus faecium* (EK13), produtor de Enterocina A, isolado no LAM- IAP SAS (Kosice, Eslováquia). A evolução do crescimento do inóculo foi acompanhada no leitor de microplacas de absorvância Sunrise™ (Tecan, Suíça).

4.4.3. Avaliação da potencial presença de bacteriocinas

Para cada amostra retirada durante o processo de produção de bacteriocinas em microplaca foi realizado um *Agar Spot Test*, de modo a auferir a potencial presença de bacteriocinas durante o processo face às diferentes condições de suplementação, pH e temperatura estudadas.

As amostras recolhidas foram colocadas em banho a 100°C durante 10 min e arrefecidas em gelo. Foram centrifugadas a 12 000 rpm durante 5 min a 4°C e o *pellet* descartado. Seguidamente foram pipetados 10 µL de cada sobrenadante em placas de *Brain Hearth Infusion* (BHI) inoculadas por incorporação com estirpes sensíveis, nomeadamente *Enterococcus avium* (EA5) e *Listeria monocytogenes* 4A CECT 934. As placas foram incubadas durante 24h a 37°C e os halos de

inibição foram registados em mm. Como controlo positivo foi utilizada a estirpe *Enterococcus faecium* (EK13).

4.4.4.Semi-purificação de substâncias inibitórias semelhantes a bacteriocinas (BLIS)

Para a Semi-Purificação das BLIS, foram selecionadas a partir dos resultados da avaliação da potencial presença de bacteriocinas, as estirpes com maior potencial de produção de bacteriocinas.

Foram adicionados 50 mL de inóculo, incubado em caldo *Man Rogosa Sharpe* (MRS) (Scharlab, Espanha), overnight a 30°C e com uma densidade ótica de $0,85 \pm 0,05$ a uma absorvância de 620 nm, a 500 mL de caldo MRS (Scharlab, Espanha), onde foram incubadas de acordo com as condições selecionadas. Após crescimento foram centrifugados a 10 000g durante 30 min. O *pellet* foi descartado e o pH do sobrenadante acertado a pH=5. Seguidamente precipitou-se as proteínas com sulfato de amónio a 4°C e agitação contínua *overnight*. Após precipitação, o caldo foi centrifugado novamente a 10 000g durante 30 min e o sobrenadante descartado. Por fim fez-se a ressuspensão do *pellet* em Tampão fosfato 10 mM pH=5, e posteriormente foi armazenado a -20°C.

Finalmente, voltou a testar-se a potencial presença de BLIS usando o método descrito anteriormente, para confirmação final da presença de potencial atividade bacteriocinogénica.

5. Resultados e discussão

5.1. Detecção e identificação de genes codificantes de bacteriocinas

Como apresentado anteriormente, o objetivo deste trabalho é a produção de bacteriocinas a partir de estirpes de *Lactiplantibacillus* e *Latilactobacillus* da coleção de estirpes do Laboratório de Tecnologia Alimentar, previamente identificadas como possíveis produtores de bacteriocinas.

Assim para a confirmação do seu potencial genético produtor de plantaricina e sakacina recorreu-se à deteção de genes codificantes destas bacteriocinas, nas estirpes em estudo por PCR.

Para *L. plantarum* fez-se a deteção dos genes codificantes da plantaricina A (*plnA*), plantaricina B (*plnB*), plantaricina C (*plnC*), plantaricina K (*plnK*), plantaricina N (*plnN*), plantaricina R (*plnR*), plantaricina L (*plnL*), plantaricina J (*plnJ*), plantaricina M (*plnM*) e plantaricina D (*plnD*).

Para *L. sakei* e *L. curvatus* fez-se a deteção dos genes codificantes da sakacina A (*sakA*), sakacina P (*sakP*) e sakacina Q (*sakQ*).

Após a revelação dos géis de agarose (figura 5.1, 5.2 e 5.3), observou-se que todas as estirpes de *L. plantarum* possuíam todos ou quase todos os genes pesquisados, enquanto que *L. curvatus* possuía o gene da sakacina Q e as estirpes de *L. sakei* revelaram não terem o gene não produtor de nenhuma das sakacinas pesquisadas, como é possível observar na tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Estudo da presença de genes codificantes de Plantaricinas e Sakacinas (+ - Positivo; - - Negativo; N/T – Não testado)

ESTIRPE	<i>plnA</i>	<i>plnB</i>	<i>plnC</i>	<i>plnK</i>	<i>plnN</i>	<i>plnR</i>	<i>lnL</i>	<i>plnJ</i>	<i>plnM</i>	<i>plnD</i>	<i>sakA</i>	<i>sakP</i>	<i>sakQ</i>
S3M3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	N/T	N/T	N/T
P05-45	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	N/T	N/T	N/T
P3B7	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	N/T	N/T	N/T
P3B8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	N/T	N/T	N/T
2L2-4	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	N/T	N/T	N/T
L1B8	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	-	-	-
L2B3	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	-	-	+
P2B3	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	-	-	-

Apesar de não se verificar a presença de genes codificantes para as sakacinas estudadas nas estirpes de *L. sakei*, não invalida que as estirpes não produzem sakacinas ou outro tipo de bacteriocina. Estirpes de *L. sakei* foram reportadas a produzirem, por exemplo, sakacina T e sakacina X (Vaughan et al., 2003), genes não pesquisados neste trabalho. Assim, como estas estirpes tinham sido previamente identificadas como possíveis produtoras de bacteriocinas foram mantidas no estudo.

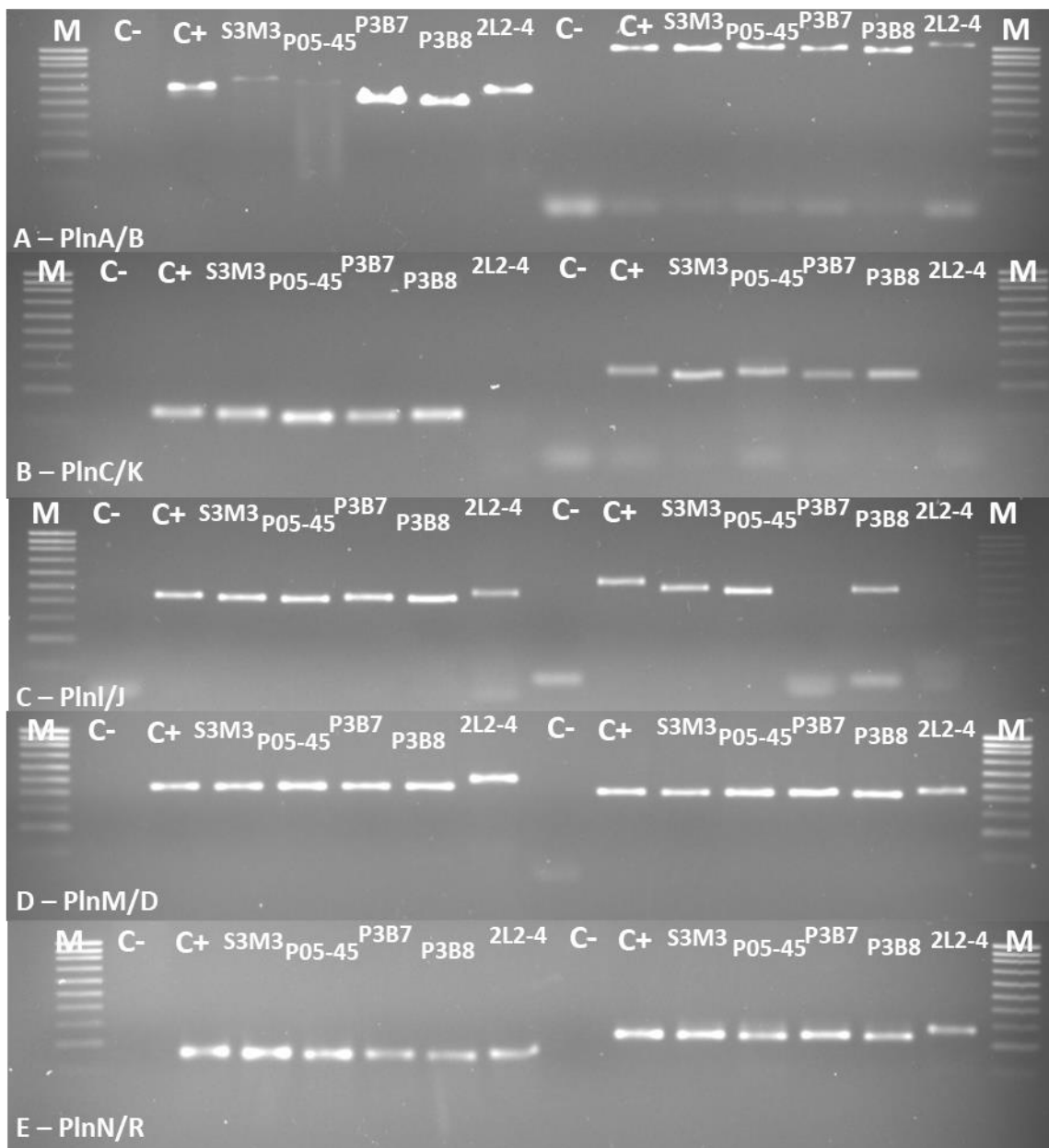


Figura 5.1 - Revelação de gel de agarose da pesquisa dos genes codificantes das Plantaricinas (A – Plantaricina A e Plantaricina B; B – Plantaricina B e Plantaricina K; C – Plantaricina I e Plantaricina J; D – Plantaricina M e Plantaricina D; E – Plantaricina N e Plantaricina R

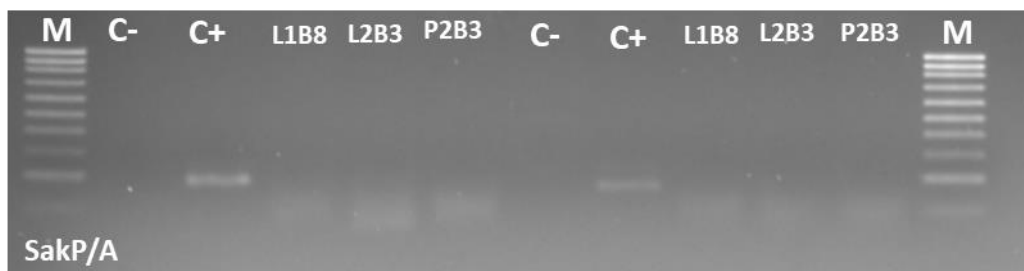


Figura 5.2 - Revelação de gel de agarose da pesquisa dos genes codificantes da Sakacina P e Sakacina A

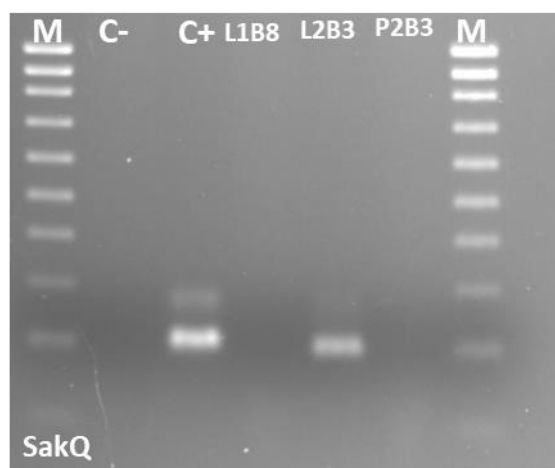


Figura 5.3 - Revelação de gel de agarose da pesquisa dos genes codificantes da Sakacina Q

5.2. Avaliação de potencial bacteriocinogénico

Seguidamente foi feita a avaliação do potencial bacteriocinogénico com o intuito de averiguar se havia, a nível fenotípico, uma resposta de produção, por parte das estirpes em estudo, num ambiente de crescimento não controlado metabólicamente.

Na ausência de Proteinase todas as estirpes em estudo revelaram poder inibitório para com as estirpes sensíveis a bacteriocinas *Enterococcus avium* (EA5) e *Listeria monocytogenes* 4A CECT 934, apresentando halos de inibição de crescimento superiores a 19 mm (figura 5.5), chegando ao valor máximo de 39 mm na presença da estirpe sensível *Listeria monocytogenes* 4A CECT 934.

Contudo nos screenings que continham Proteinase K, com o intuito de identificar se esta inibição era provocada por moléculas de origem proteica, as amostras deram negativo, como é possível verificar na figura 5.4, pela presença de um halo de inibição junto ao poço que continha a Proteinase K.

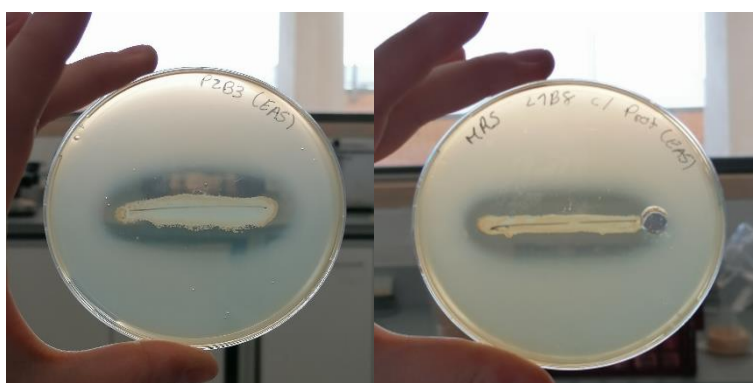


Figura 5.4 – *Screening* de produção de bacteriocinas (sem Proteinase K - à direita; com Proteinase K - à esquerda) A ausência de inibição perto do poço de Proteinase K na imagem à direita, é indicativo que a inibição verificada não é de natureza proteica.

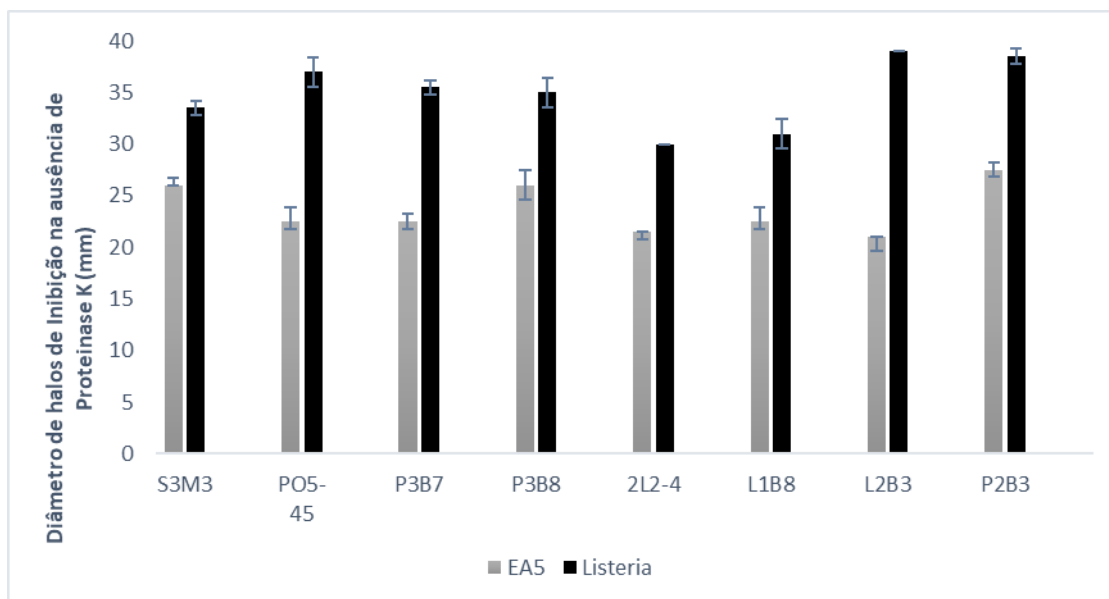


Figura 5.5 - *Screening* ao poder inibitório das estirpes na ausência de stress ambiental e não produzindo bacteriocidas

Isto é indicativo que a inibição registada anteriormente é muito provavelmente feita pelo ácido láctico produzido pelas estirpes, pois se fosse de origem proteica teria sido observado crescimento microbiano em redor do poço que continha Proteinase K, uma protease capaz de degradar bacteriocinas. Este teste veio a confirmar a necessidade de induzir um stress ambiental de modo a desencadear uma resposta SOS e consequentemente ativar os genes produtores de bacteriocinas presentes.

5.3. Teste de suscetibilidade a antimicrobianos

Tratando-se de estirpes utilizadas em produtos alimentares e visto as bacteriocinas terem um grande potencial na área alimentar, era de extrema importância verificar a sua segurança para consumo humano.

Tabela 5.2 - Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos com respetivos halos de inibição (em mm) e categorização de acordo com os breakpoints (S – Sensível; I – Intermédio; R – Resistente). (E 15µg - Eritromicina 15 µg; TE 30µg - Tetraciclina 30 µg; VA 30µg - Vancomicina 30 µg; RD 5 µg - Rifampicina 5 µg; CN 10µg - Gentamicina 10 µg; MY 15µg - Lincomicina 15 µg; C 30µg - Clorofenicol 30 µg; P 10UI - Penicilina G 10 UI; QD 15µg - Quinopristina/Dalfopristina 15 µg)

ESTIRPE	ESPÉCIE	E 15µg	TE 30µg	VA 30µg	MY 15µg	C 30µg	QD 15µg	RD 5µg	CN 10µg	P 10UI
S3M3	L. plantarum	I ²²	I ^{15,5}	R ⁶	I ^{18,5}	S ²²	R ²⁰	R ¹⁶	S ¹⁹	R ⁶
PO5-45	L. plantarum	S ^{34,5}	R ^{13,5}	R ⁶	I ^{20,5}	S ²²	S ^{21,5}	R ¹⁵	S ^{23,5}	R ⁶
P3B7	L. plantarum	S ³³	R ^{14,5}	R ⁶	I ^{20,5}	S ^{20,5}	S ^{20,5}	R ^{11,5}	S ^{21,5}	R ⁶
P3B8	L. plantarum	S ²³	R ⁶	R ⁶	I ¹⁸	S ¹⁹	S ²³	R ¹⁴	I ¹⁶	R ⁶
2L2-4	L. plantarum	S ³¹	R ¹⁵	R ⁶	I ^{16,5}	S ^{21,5}	S ^{21,5}	I ¹⁷	I ¹⁷	R ⁶
L1B8	L. sakei	S ³²	R ¹⁵	R ⁶	S ^{22,5}	S ^{20,5}	S ^{20,5}	R ^{15,5}	S ^{21,5}	R ⁶
L2B3	L. curvatus	S ²⁴	R ⁶	R ⁶	I ¹⁹	S ¹⁹	S ²³	R ¹³	I ¹⁶	R ⁶
P2B3	L. sakei	S ^{34,5}	R ^{14,5}	R ⁶	I ^{15,5}	S ¹⁹	S ²³	R ¹²	I ^{16,5}	R ⁶

A suscetibilidade aos antimicrobianos foi classificada como resistente (R), intermédio (I) e suscetível (S) dependendo das respostas microbianas (tabela 5.2). Estes antimicrobianos foram selecionados tendo em conta a literatura atual (tabela 2.3) e foi tido em conta a classe e modo de atuação dos mesmos.

É de salientar a confirmação da resistência intrínseca a vancomicina presente em *Lactiplantibacillus* e *Latilactobacillus*. Verificou-se também a resistência à rifampicina, penicilina e tetraciclina. Estas resistências são indicativas da origem animal das estirpes utilizadas visto que a penicilina e a rifampicina são resistências adquiridas através de pressões seletivas como a exposição constante a estes antibióticos. Já a tetraciclina trata-se de uma resistência adquirida, através da transferência horizontal de genes, naturalmente através de plasmídeos genéticos móveis (Mathur & Singh, 2005). Perante esta situação convém monitorizar o uso destas espécies.

Neste trabalho estas estirpes foram utilizadas para a potencial produção de bacteriocinas e não se pretende a sua aplicação diretamente em, por exemplo, produtos alimentares.

5.4. Avaliação da taxa de crescimento populacional das estirpes em estudo em função das diferentes temperaturas

De modo a iniciar e avaliar o crescimento microbiano das estirpes em estudo foi necessário padronizar o inóculo inicial, de modo a garantir que cada ensaio iniciava com o mesmo número de cfu. Para isso foi feita a contagem de cfu em inóculos com uma densidade ótica de $0,85 \pm 0,05$ (tabela 5.3).

Tabela 5.3 - Contagem de cfu/mL em inóculos com densidades óticas de $0,85 \pm 0,05$

Estirpes	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	Média Ponderada (cfu/mL)
S3M3			34	3	4,07E-08
PO5-45	-	-	26	5	3,41E-08
P3B7	-	-	27	2	3,19E-08
P3B8	-	-	26	4	3,30E-08
2L2-4	-	-	486	51	5,91E-07
L1B8	-	-	30	1	3,41E-08
L2B3	-	232	36	0	2,95E-06
P2B3	-	-	40	4	4,84E-08
S3M3	-	-	40	4	4,84E-08

De modo a identificar a fase exponencial de crescimentos das várias estirpes foram realizadas as curvas de crescimento a 30°C com pH inicial= $6,3 \pm 0,1$ e 20°C com pH inicial= $6,3 \pm 0,1$, em meio MRS não suplementado (Figura 5.6)

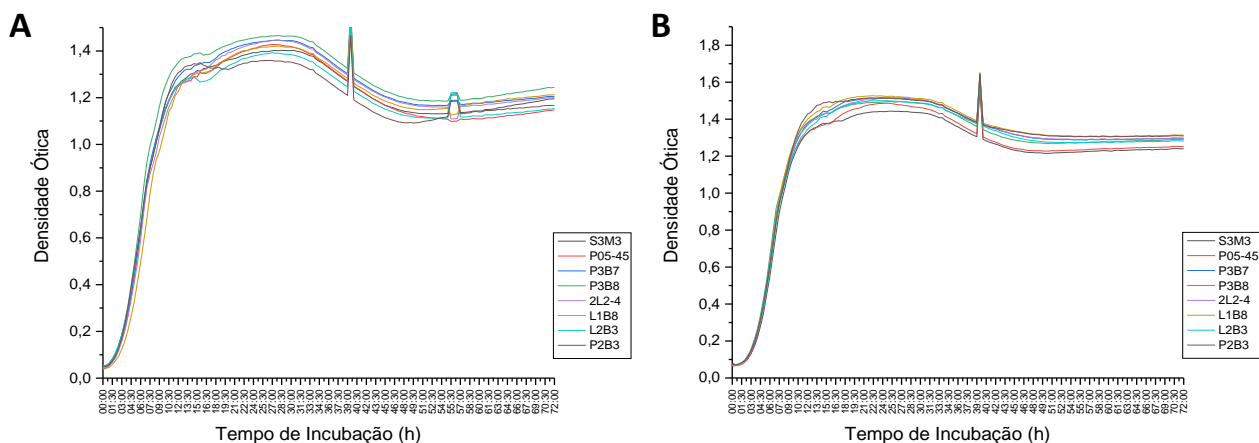


Figura 5.6 - Curvas de crescimento utilizadas no cálculo da taxa de replicação e identificação da fase exponencial de crescimento (A - T=30°C e pH inicial=6,3± 0,1; B - 20°C e pH inicial=6,3± 0,1)

A partir das curvas feita a regressão linear das mesmas e o valor de declive obtido foi utilizado no cálculo das taxas de replicação de cada estirpe (tabela 5.4 e 5.5).

Tabela 5.41 - Tempo de Replicação e identificação da fase exponencial de crescimento a 30°C com pH inicial=6,3± 0,1, em meio MRS não suplementado

30°C	$\mu(h^{-1})$	$g(h)$	t(min)	t(s)	t replicação	Fase exponencial
S3M3	3,75664	0,184473	11,068	4,08	11min 4s	[8h30;16h30]
P05-45	3,3422	0,207348	12,441	26,46	12min 26s	[7h;15h]
P3B7	4,32059	0,160395	9,624	37,44	9min 37s	[8h;16h30h]
P3B8	4,14019	0,167384	10,043	2,58	10 min 2s	[8h30;15h30h]
2L2-4	3,49826	0,198098	11,886	53,16	11min 53s	[7h30;17h]
L1B8	4,29293	0,161428	9,686	41,16	9min 41s	[8h30;16h30h]
L2B3	3,84563	0,180205	10,812	48,72	10min 48s	[8h30;15h30]
P2B3	3,48937	0,198603	11,916	54,96	11min 54s	[8h30;17h]

Tabela 5.5 - Tempo de Replicação e identificação da fase exponencial de crescimento a 20°C com pH inicial=6,3± 0,1, em meio MRS não suplementado

20°C	$\mu(h^{-1})$	$g(h)$	t(min)	t(s)	t replicação	Fase exponencial
S3M3	1,3694	0,506061	30,364	21,84	30min 21s	[8h30;15h30]
P05-45	1,26742	0,54678	32,807	48,42	32min 48s	[7h;17h30]
P3B7	1,22514	0,56565	33,939	56,34	33min 56s	[8h30;16h30]
P3B8	1,3206	0,524761	31,486	29,16	31 min 29s	[8h30;16h]
2L2-4	1,32334	0,523675	31,420	25,2	32min 25s	[8h30;17h]
L1B8	1,28598	0,538889	32,333	19,98	32min 19s	[8h;16h]
L2B3	1,34609	0,514824	30,889	53,34	30min 53s	[8h;16h30]
P2B3	1,51105	0,458621	27,517	31,02	27min 31s	[8h30;15h]

Isto permitiu identificar o horário em que as estirpes entravam em fase exponencial de crescimento permitindo estabelecer os tempos de recolha de amostras para avaliação da potencial produção de bacteriocinas em função dos fatores nutricionais, temperatura e pH. Foram escolhidos 12 pontos de recolha: t=7h, t=8h, t=9h, t=10h, t=11h, t=12h, t=13h, t=14h, t=15h, t=24h, t=48h, t=72h.

De um modo geral as estirpes apresentam fases exponenciais de crescimento semelhantes, entre as 7h e as 17h de incubação, nas duas condições testadas, onde a partir desse tempo de incubação a estirpes entravam em fase estacionária de crescimento. A maior diferença foi nos tempos de replicação, onde com a diminuição da temperatura de incubação a taxa de replicação subiu, em média dos 10 minutos para os 30 minutos, contudo não houve grandes diferenças a nível de intervalo de tempo da fase exponencial.

A 20°C é possível observar um crescimento microbiano maior no final da fase exponencial/ início da fase estacionária, e um início da fase estacionária mais estável (figura 5.6). Isto pode ser indicativo que a 30°C havia uma menor disponibilidade de nutrientes no final da fase exponencial, maioritariamente motivada pelo rápido tempo de geração, o que prova que a temperatura estava a agir como um fator de stress.

5.5. Avaliação da potencial produção de bacteriocinas em função dos fatores nutricionais, temperatura e pH

Foram feitas no total 20 curvas de crescimento para cada estirpe: a 30°C com pH inicial=6,3± 0,1, 30°C com pH inicial=5,8± 0,1, 20°C com pH inicial=6,3± 0,1 e a 20°C com pH inicial=5,8± 0,1. Cada uma destas condições foi aplicadas nos 5 meios de cultura testados, nomeadamente, MRS normal, MRS com extrato de carne 15 g/L, MRS com extrato de carne 20 g/L, MRS suplementado com Vitamina B e MRS suplementado com Ferro.

O meio MRS normal foi utilizado como controlo simulando as condições de crescimento normais *in vitro*.

O MRS com extrato de carne a 15g/L e 20 g/L foi utilizado para simular um ambiente rico em fontes de carbono e nitrogénio, visto que para além do extrato de carne adicionado o MRS contém extrato de levedura. A utilização de um meio rico neste nutriente tem sido reportada como condições ótimas para a produção de plantaricinas (Verellen et al., 1998), pediocinas (Skyttä et al., 1993) e helveticinas (Joerger & Klaenhammer, 1986).

O MRS suplementado com Vitamina B tem também sido referido em vários estudos como (Todorov et al., 2011) e (Todorov & Dicks, 2006). Várias vitaminas do complexo B servem como coenzimas, auxiliando as enzimas em várias reações metabólicas. As coenzimas derivadas das vitaminas B participam da biossíntese de aminoácidos e peptídeos, incluindo aqueles necessários para a produção de bacteriocinas.

Apesar da espécie *L. plantarum*, não necessitar de ferro para o seu crescimento, a espécie *L. sakei* necessita deste nutriente essencial para o crescimento bacteriano, podendo a sua disponibilidade no ambiente impactar a produção de bacteriocinas. Assim a alteração da concentração de ferro no ambiente pode causar impactos diretos ou indiretos na produção de bacteriocinas, podendo a sua disponibilidade criar um fator de stress ambiental (Elli et al., 2000), tornando o MRS suplementado em Ferro um bom candidato para este estudo.

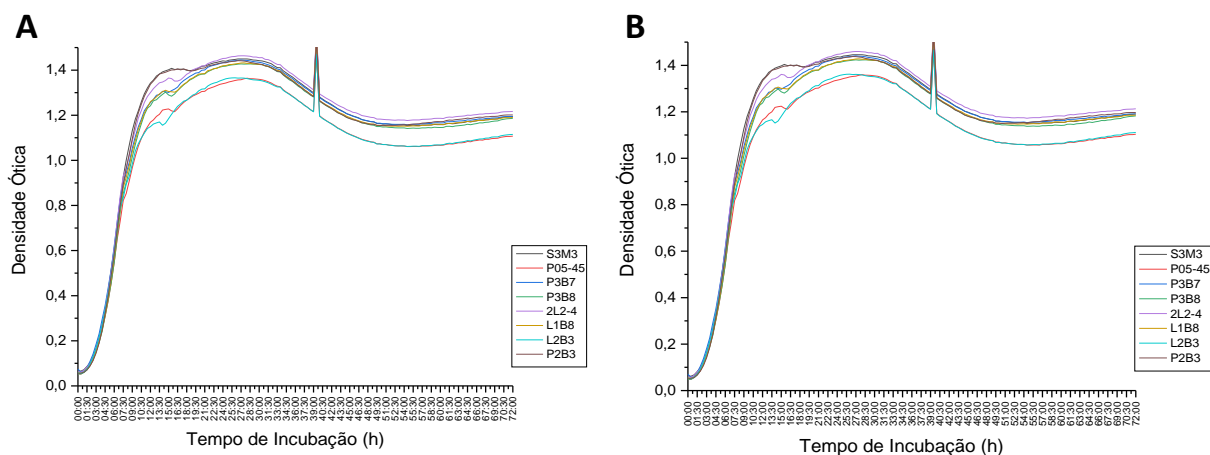


Figura 5.7 - Efeito do pH no crescimento microbiano em meio MRS suplementado com Vitamina B (A - T=30°C e pH inicial=6,3± 0,1; B - T=30°C e pH inicial=5,8± 0,1)

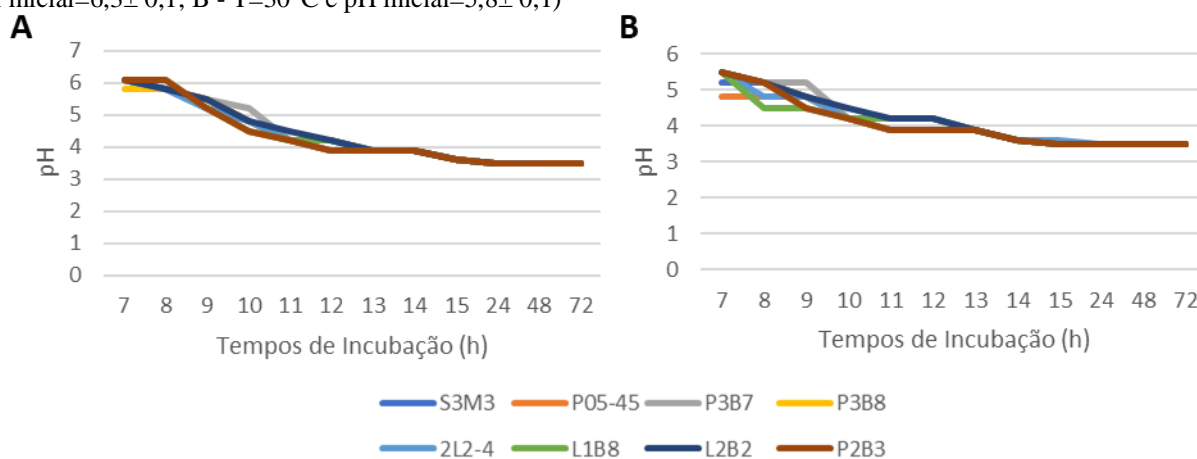


Figura 5.8 - Evolução do pH durante a fase exponencial de crescimento microbiano em meio MRS suplementado com Vitamina B (A - T=30°C e pH inicial=6,3± 0,1; B - T=30°C e pH inicial=5,8± 0,1)

Com a descida do pH inicial de 6,3 para 5,8 não foram observadas alterações a nível de crescimento microbiano (figura 5.7). Isto é reforçado com a análise das leituras de pH registadas ao longo do tempo (figura 5.8).

Apesar do pH inicial ser diferente, registou-se em ambos uma diminuição lenta e gradual do pH terminando em *plateau* em valores de 3,5 a partir das 15h de crescimento. Isto sugere a ativação do mecanismo de neutralização de pH que estas bactérias possuem, onde não se verifica um aumento do pH mas sim a estabilização do pH abaixo do valor de pKa do ácido láctico.

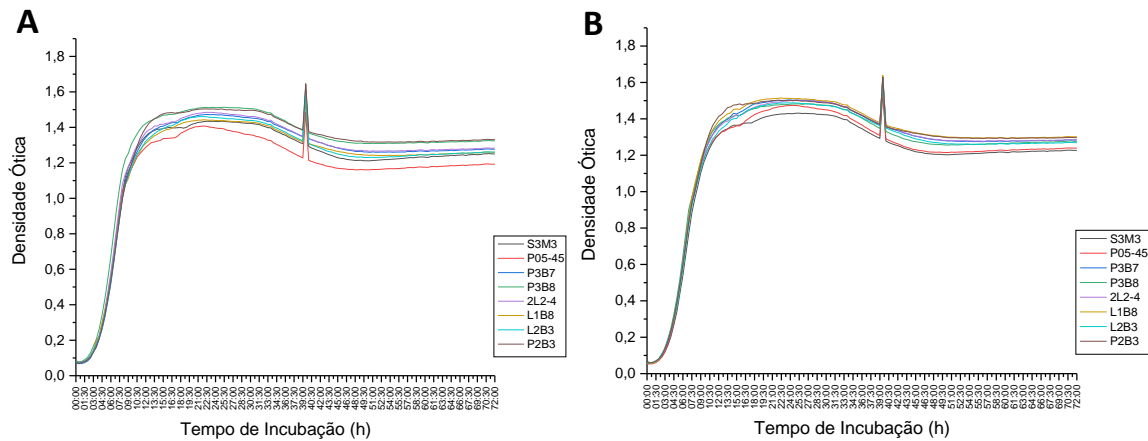


Figura 5.9 - Efeito dos nutrientes no crescimento microbiano a $T=20^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH inicial}=5,8\pm 0,1$ (A - MRS com extrato de carne 20 g/L; B - MRS com extrato de carne 15 g/L)

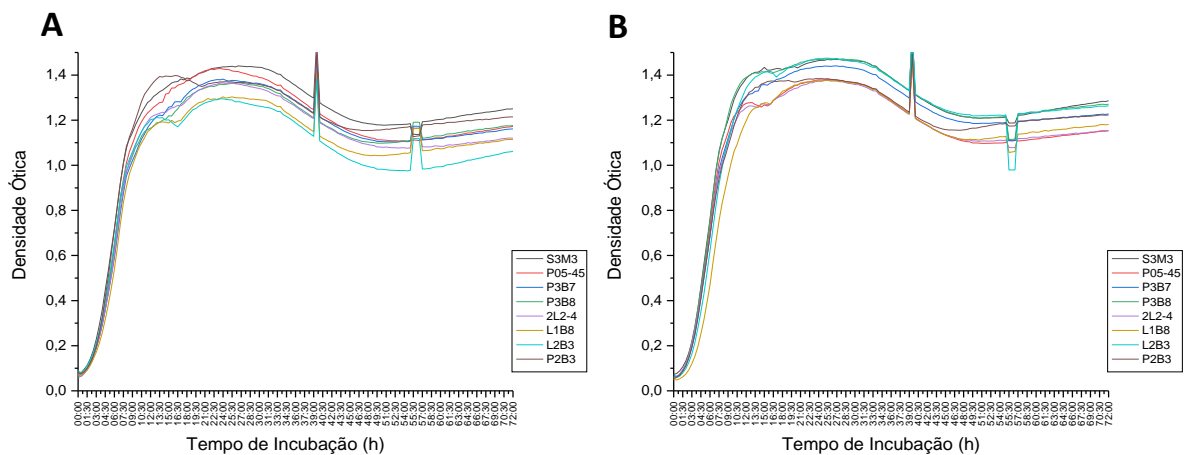


Figura 5.10 - Efeito dos nutrientes no crescimento microbiano a $T=30^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH inicial}=6,3\pm 0,1$ (A - MRS com extrato de carne 20 g/L; B - MRS com extrato de carne 15 g/L)

A nível de nutrientes, enquanto em praticamente todos ou meios não se registou nenhuma alteração de crescimento relevante, observou-se uma diferença a nível de crescimento mais distinta a nível de certas estirpes, quando se compara as diferentes concentrações de extrato de carne utilizado, 15 g/L e 20 g/L. Como é possível observar pela figura 5.9, a 20°C a alteração de concentrações afetou mais o crescimento das estirpes de *L. plantarum* que as de *L. sakei* ou *L. curvatus*, especialmente a estirpe P05-45, que na concentração mais alta de extrato de carne apresentou uma diminuição de crescimento relativamente à concentração mais baixa. Também na concentração mais alta de extrato de carne, a estirpe P3B8 apresentou uma fase exponencial de crescimento mais rápida que as outras estirpes na mesma condição possivelmente devido à disponibilidade de nutrientes.

Já a uma temperatura de 30°C (figura 5.10), a estirpe de *L. sakei* L2B3, teve a mesma tendência de crescimento que a estirpe P05-45 teve a 20°C , em que apresentou uma diminuição de crescimento relativamente na concentração mais alta de extrato de carne. Também nas mesmas condições, a estirpe *L. sakei* L1B8, teve uma fase *lag* mais demorada na concentração mais baixa

de extrato de carne. Isto sugere uma maior dificuldade de adaptação por parte da estirpe a concentrações mais baixas de extrato de carne.

5.6. Avaliação da potencial presença de bacteriocinas

Para a verificação da produção de bacteriocinas as amostras recolhidas foram submetidas a um *Agar Spot Test*. Os resultados foram registados apenas pela presença ou ausência de halo de inibição. De todas as amostras foram selecionas 7 condições com resultados mais favoráveis para proceder à fase de semi-purificação (tabela 5.6).

Tabela 5.6 - Seleção das 7 condições com resultados mais favoráveis para proceder à fase de semi-purificação

Estirpe		pH	T (°C)	t (h) incubação	Meio Cultura
P2B3	<i>L. sakei</i>	6,3	30	72	MRS com extrato de carne 20 g/L
P3B7	<i>L. plantarum</i>	6,3	30	48	MRS suplementado com Ferro
P3B7	<i>L. plantarum</i>	6,3	30	72	MRS com extrato de carne 20 g/L
L1B8	<i>L. sakei</i>	6,3	30	72	MRS com extrato de carne 20 g/L
L1B8	<i>L. sakei</i>	6,3	30	48	MRS suplementado com Vitamina B
S3M3	<i>L. plantarum</i>	6,3	30	72	MRS suplementado com Vitamina B
S3M3	<i>L. plantarum</i>	6,3	30	24	MRS com extrato de carne 20 g/L

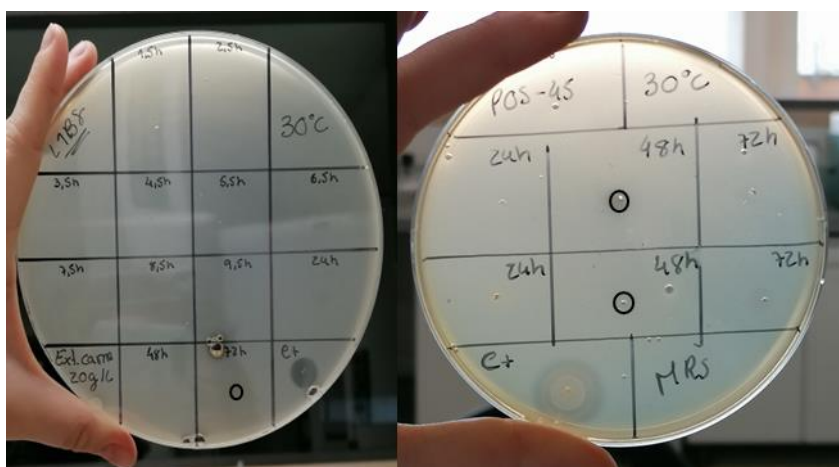


Figura 5.11 - Avaliação da potencial presença de bacteriocinas em função dos fatores nutricionais, temperatura e pH, contra *Listeria monocytogenes*. Os círculos a preto foram adicionados de modo a facilitar a visualização dos halos de inibição.

Após a semi-purificação foi repetido o *Agar Spot Test* de modo a confirmar a presença de bacteriocinas e tentar quantificar a sua atividade. Contudo todas as amostras tiveram resultados negativos, ou seja, não havia presença de inibição (figura 5.11). Isto prova que as condições testadas não induziram e criaram um ambiente de stress celular, nem levaram à produção de BLIS.

Provavelmente todos os halos de inibição observados anteriormente sejam o resultado de inibição pela produção de ácido láctico ou outro mecanismo celular.

Em trabalhos futuros seria interessante estudar outras condições na tentativa de induzir a produção de bacteriocinas. Uma das alternativas é a adição de triptona e extrato de levedura no meio de cultura, tendo tido bastante sucesso em outros trabalhos como (Todorov & Dicks, 2007), ou até mesmo fazer o crescimento microbiano juntamente com bactérias patogênicas, como a *Listeria monocytogenes*, com o intuito de criar um ambiente competitivo e assim induzir a produção de bacteriocinas (Miranda-Castilleja et al., 2016).

6. Conclusões

Este trabalho teve como principal objetivo a otimização de produção de bacteriocinas em *Lactiplantibacillus* e *Lactilactobacillus*, para tal foi necessário começar com uma abordagem molecular e fenotípica de modo a garantir que estávamos a trabalhar com espécies produtoras e seguras.

Na caracterização molecular todas as estirpes de *L. platarum* revelaram possuir vários ou até mesmo todos os genes produtores das plantaricinas estudadas. Já as estirpes de *L. sakei* revelaram exatamente o contrário, ao não possuírem nenhum dos genes codificantes das sakacinas estudadas. Isto não invalida que estas estirpes não produzem outro tipo de sakacinas ou até mesmo outras bacteriocinas, continuando a sua utilização a ser relevante para este trabalho.

Na caracterização fenotípica os resultados foram bastante homogêneos. No teste de sensibilidade a antimicrobianos foi confirmada a resistência intrínseca à vancomicina característica das espécies estudadas. Contudo este teste revelou resistência à rifampicina, penicilina e tetraciclina que tornam estas estirpes não próprias para consumo humano. Enquanto a rifampicina e a penicilina são resistências adquiridas por exposição constante a antimicrobianos, a tetraciclina é uma das resistências mais reportadas, sendo adquirida a partir da transferência horizontal de genes.

Contudo, sendo a finalidade deste trabalho a produção de bacteriocinas e sua semi-purificação, estas estirpes nunca chegam a ser utilizadas diretamente continuando a ser seguro a sua utilização neste trabalho.

Na avaliação de potencial bacteriocinogénico realizado em condições de crescimento populacional não controladas metabolicamente, todas as estirpes revelaram ter algum poder inibitório, contudo como posteriormente revelado pela adição de protease esta inibição era provocada pelo ácido láctico ou outro metabolito produzido pelas mesmas, confirmando a necessidade de induzir os genes produtores a partir do stress metabólico.

Durante o estudo do crescimento das estirpes em várias condições, verificou-se uma homogeneidade no aspeto das curvas de crescimento assim como no início e duração das fases exponenciais, que em média duravam 10h. Isto permitiu a escolha de 12 pontos de recolha de amostra durante a avaliação da potencial produção de bacteriocinas em função dos fatores nutricionais, temperatura e pH. A maior diferença verificou-se nos tempos de replicação a temperaturas diferentes, onde a taxa de replicação subiu, dos 10 minutos para os 30 minutos.

A avaliação da potencial produção de bacteriocinas em função dos fatores nutricionais, temperatura e pH, submetendo as estirpes a 5 meios de culturas diferentes (MRS normal, MRS com extrato de carne 15 g/L, MRS com extrato de carne 20 g/L, MRS suplementado com Vitamina B e MRS suplementado com Ferro), 2 temperaturas (20 °C e 30 °C) e 2 pH (5,8 e 6,3). Tendo sido avaliadas 20 condições de crescimento. Isto permitiu auferir que, para as estirpes estudadas, apenas os fatores nutricionais e a temperatura agiram como fatores de stress.

A nível da temperatura foi observado a 30°C um crescimento microbiano mais rápido que resultou na menor disponibilidade de nutrientes no final da fase exponencial mais rapidamente.

A nível nutricional, registou-se uma diferença a nível de crescimento comparando as diferentes concentrações de extrato de carne utilizadas, 15 g/L e 20 g/L. A 20°C, estirpe *L. plantarum* P05-45 apresentou uma diminuição de crescimento no meio suplementado com extrato de carne 20 g/L, comparativamente no meio com a concentração mais baixa. A 30°C, a estirpe de *L. sakei* L2B3 apresentou a mesma tendência de crescimento que a estirpe P05-45 teve a 20°C, e a estirpe *L. sakei* L1B8, teve uma fase *lag* mais demorada na concentração mais baixa de extrato de carne, demorando mais tempo a adaptar-se às concentrações mais baixas de extrato de carne.

Contudo, apesar das várias condições de crescimento populacional estudadas, seja a nutricional, pH e temperatura, não foi possível induzir a produção de bacteriocinas. Assim um dos desafios futuros e de modo a dar continuidade a este trabalho, seria explorar outras fontes de suplementação como a triptona ou extrato de levedura, ou simular um ambiente competitivo *in vitro* pondo estas estirpes a incubar juntamente com estirpes patogénicas, um método que tem mostrado muito sucesso na literatura.

Trabalhos como este permitem explorar o funcionamento metabólico de espécies produtoras de bacteriocinas, moléculas com um potencial tecnológico incrível e ainda pouco explorado.

7. Referências bibliográficas

- Aasen, I. M., Møretrø, T., Katla, T., Axelsson, L., & Storrø, I. (2000). Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(2), 159–166. <https://doi.org/10.1007/s002530050003>
- Abdulhussain Kareem, R., & Razavi, S. H. (2020). Plantaricin bacteriocins: As safe alternative antimicrobial peptides in food preservation—A review. *Journal of Food Safety*, 40(1). <https://doi.org/10.1111/jfs.12735>
- Adams, M. R., & Moss, M. O. (2000). The microbiology of food preservation. In *Food Microbiology* (pp. 65–120). The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781847550880-00065>
- Alharbi, B. F., & Alateek, A. A. (2024). Investigating the influence of probiotics in preventing Traveler’s diarrhea: Meta-analysis based systematic review. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 59, 102703. <https://doi.org/10.1016/J.TMAID.2024.102703>
- Ammor, M. S., Gueimonde, M., Danielsen, M., Zagorec, M., Van Hoek, A. H. A. M., De Los Reyes-Gavilán, C. G., Mayo, B., & Margolles, A. (2008). Two different tetracycline resistance mechanisms, plasmid-carried tet(L) and chromosomally located transposon-associated tet(M), coexist in *Lactobacillus sakei* rits 9. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(5). <https://doi.org/10.1128/AEM.01463-07>
- Anisimova, E., & Yarullina, D. (2018). Characterization of Erythromycin and Tetracycline Resistance in *Lactobacillus fermentum* Strains. *International Journal of Microbiology*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/3912326>
- Aquilanti, L., Garofalo, C., Osimani, A., & Clementi, F. (2016). Ecology of lactic acid bacteria and coagulase negative cocci in fermented dry sausages manufactured in Italy and other Mediterranean countries: An overview. In *International Food Research Journal* (Vol. 23, Issue 2).
- Batt, C. A. (2014). *Lactobacillus*: Introduction. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*, 2, 409–411. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00176-2>
- Bengtsson, J., Adlerberth, I., Östblom, A., Saksena, P., Öresland, T., & Börjesson, L. (2016). Effect of probiotics (*Lactobacillus plantarum* 299 plus *Bifidobacterium* Cure21) in patients with poor ileal pouch function: a randomised controlled trial. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 51(9), 1087–1092. <https://doi.org/10.3109/00365521.2016.1161067>
- Callewaert, R., Hugas, M., & Vuyst, L. De. (2000). Competitiveness and bacteriocin production of Enterococci in the production of Spanish-style dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 57(1–2). [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00228-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00228-2)
- Campedelli, I., Mathur, H., Salvetti, E., Clarke, S., Rea, M. C., Torriani, S., Ross, R. P., Hill, C., & O’Toole, P. W. (2019). Genus-wide assessment of antibiotic resistance in *Lactobacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(1). <https://doi.org/10.1128/AEM.01738-18>
- Casaburi, A., Di Martino, V., Ferranti, P., Picariello, L., & Villani, F. (2016). Technological properties and bacteriocins production by *Lactobacillus curvatus* 54M16 and its use as starter culture for fermented sausage manufacture. *Food Control*, 59. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.05.016>

- Chang, G., Sun, J., Li, J., & Li, T. (2024). Effect of Probiotics on Portal Hypertension (PH) with Cirrhosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 48(6), 102361. <https://doi.org/10.1016/J.CLINRE.2024.102361>
- Chopra, I., & Roberts, M. (2003). Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(2), 232–260. <https://doi.org/10.1128/membr.65.2.232-260.2001>
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2023). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 33rd Edition*.
- Cocolin, L., Foschino, R., Comi, G., & Grazia Fortina, M. (2007). Description of the bacteriocins produced by two strains of *Enterococcus faecium* isolated from Italian goat milk. *Food Microbiology*, 24(7–8), 752–758. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.03.001>
- Coculescu, B.-I. (2009). Antimicrobial resistance induced by genetic changes. *Journal of Medicine and Life*, 2(2), 114–123.
- Colombo, M., Nero, L. A., & Todorov, S. D. (2020). Safety profiles of beneficial lactic acid bacteria isolated from dairy systems. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(2). <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00227-y>
- Corsetti, A., & Settanni, L. (2007). Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Research International*, 40(5), 539–558. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.11.001>
- Crispie, F., Flynn, J., Ross, R. P., Hill, C., & Meaney, W. J. (2004). Update on the development of a novel dry cow therapy using a bismuth-based intramammary teat seal in combination with the bacteriocin lacticin 3147. In *Irish Veterinary Journal* (Vol. 57, Issue 11). <https://doi.org/10.1186/2046-0481-57-11-652>
- Dec, M., Nowaczek, A., Stępień-Pyśniak, D., Wawrzykowski, J., & Urban-Chmiel, R. (2018). Identification and antibiotic susceptibility of lactobacilli isolated from turkeys. *BMC Microbiology*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1269-6>
- Di Gioia, D., Mazzola, G., Nikodinoska, I., Aloisio, I., Langerholc, T., Rossi, M., Raimondi, S., Melero, B., & Rovira, J. (2016). Lactic acid bacteria as protective cultures in fermented pork meat to prevent *Clostridium* spp. growth. *International Journal of Food Microbiology*, 235. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.019>
- Duche, R. T., Singh, A., Wandhare, A. G., Sangwan, V., Sihag, M. K., Nwagu, T. N. T., Panwar, H., & Ezeogu, L. I. (2023). Antibiotic resistance in potential probiotic lactic acid bacteria of fermented foods and human origin from Nigeria. *BMC Microbiology*, 23(1), 142. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02883-0>
- Duhutrel, P., Bordat, C., Wu, T.-D., Zagorec, M., Guerquin-Kern, J.-L., & Champomier-Vergès, M.-C. (2010). Iron sources used by the nonpathogenic lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* as revealed by electron energy loss spectroscopy and secondary-ion mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(2), 560–565. <https://doi.org/10.1128/AEM.02205-09>
- EFSA. (n.d.). *Qualified presumption of safety (QPS) | EFSA*. Retrieved June 1, 2024, from <https://www.efsa.europa.eu/en/applications/qps-assessment>
- El Issaoui, K., Khay, E. O., Abrini, J., Zinebi, S., Amajoud, N., Senhaji, N. S., & Abriouel, H. (2021). Molecular identification and antibiotic resistance of bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated from table olives. *Archives of Microbiology*, 203(2).

<https://doi.org/10.1007/s00203-020-02053-0>

- Elli, M., Zink, R., Rytz, A., Reniero, R., & Morelli, L. (2000). Iron requirement of *Lactobacillus* spp. in completely chemically defined growth media. *Journal of Applied Microbiology*, 88(4), 695–703. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01013.x>
- Endo, A., Futagawa-Endo, Y., & Dicks, L. M. T. (2011). Influence of carbohydrates on the isolation of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 110(4), 1085–1092. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2011.04966.X>
- Endo, H. M., Bandeca, S. C. S., Olchanheski, L. R., Schemczssen-Graeff, Z., & Pileggi, M. (2024). Probiotics and the reduction of SARS-CoV-2 infection through regulation of host cell calcium dynamics. *Life Sciences*, 350, 122784. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2024.122784>
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). (2022). *Clinical breakpoints - breakpoints and guidance*. 15. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_12.0_Breakpoint_Tables.pdf
- FDA. (2023, October 17). *Generally Recognized as Safe (GRAS) / FDA*. <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/generally-recognized-safe-gras>
- Fedorak, R. N., Feagan, B. G., Hotte, N., Leddin, D., Dieleman, L. A., Petrunia, D. M., Enns, R., Bitton, A., Chiba, N., Paré, P., Rostom, A., Marshall, J., Depew, W., Bernstein, C. N., Panaccione, R., Aumais, G., Steinhart, A. H., Cockeram, A., Bailey, R. J., ... Madsen, K. (2015). The Probiotic VSL#3 Has Anti-inflammatory Effects and Could Reduce Endoscopic Recurrence After Surgery for Crohn's Disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 13(5), 928-935.e2. <https://doi.org/10.1016/J.CGH.2014.10.031>
- Feld, L., Schjørring, S., Hammer, K., Licht, T. R., Danielsen, M., Krogfelt, K., & Wilcks, A. (2008). Selective pressure affects transfer and establishment of a *Lactobacillus plantarum* resistance plasmid in the gastrointestinal environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(4). <https://doi.org/10.1093/jac/dkn033>
- Freiberg, J. A., Le Breton, Y., Harro, J. M., Allison, D. L., McIver, K. S., & Shirliff, M. E. (2020). The Arginine Deiminase Pathway Impacts Antibiotic Tolerance during Biofilm-Mediated *Streptococcus pyogenes* Infections. *MBio*, 11(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.00919-20>
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L., & Omar, N. Ben. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120(1–2), 51–70. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2007.06.001>
- Gao, Y., Li, D., Sheng, Y., & Liu, X. (2011). Mode of action of sakacin C2 against *Escherichia coli*. *Food Control*, 22(5). <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.07.010>
- García-Vicente, E. J., Rey-Casero, I., Martín, M., Pérez, A., Benito-Murcia, M., & Risco, D. (2024). Oral supplementation with postbiotics modulates the immune response produced by myxomatosis vaccination in wild rabbits. *Vaccine*. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2024.05.026>
- Garsa, A. K., Kumariya, R., Sood, S. K., Kumar, A., & Kapila, S. (2014). Bacteriocin Production and Different Strategies for Their Recovery and Purification. In *Probiotics and Antimicrobial Proteins* (Vol. 6, Issue 1). <https://doi.org/10.1007/s12602-013-9153-z>
- Gaspar, C., Donders, G. G., Palmeira-de-Oliveira, R., Queiroz, J. A., Tomaz, C., Martinez-de-

- Oliveira, J., & Palmeira-de-Oliveira, A. (2018). Bacteriocin production of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* KS400. *AMB Express*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0679-z>
- Gillor, O., Etzion, A., & Riley, M. A. (2008). The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(4), 591–606. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1726-5>
- Gkitsaki, I., Potsaki, P., Dimou, I., Laskari, Z., Koutelidakis, A., & Giaouris, E. (2024). Development of a functional Greek sheep yogurt incorporating a probiotic *Lactocaseibacillus rhamnosus* wild-type strain as adjunct starter culture. *Heliyon*, 10(2), e24446. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2024.E24446>
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., & Rizzello, C. G. (2007). The relative contributions of starter cultures and non-starter bacteria to the flavour of cheese. In *Improving the Flavour of Cheese*. <https://doi.org/10.1533/9781845693053.1.121>
- González-Orozco, B. D., McGovern, C. J., Barringer, S. A., Simons, C., Jiménez-Flores, R., & Alvarez, V. B. (2024). Development of probiotic yogurt products incorporated with *Lactobacillus kefirianofaciens* OSU-BSGOA1 in mono- and co-culture with *Kluyveromyces marxianus*. *Journal of Dairy Science*. <https://doi.org/10.3168/JDS.2024-24756>
- Gonzalez, B., Glaasker, E., Kunji, E. R. S., Driessen, A. J. M., Suarez, J. E., & Konings, W. N. (1996). Bactericidal mode of action of plantaricin C. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(8). <https://doi.org/10.1128/aem.62.8.2701-2709.1996>
- Goya-Jorge, E., Gonza, I., Bondue, P., Druart, G., Al-Chihab, M., Boutaleb, S., Douny, C., Taminiou, B., Daube, G., Scippo, M. L., Thonart, P., & Delcenserie, V. (2024). Unveiling the influence of a probiotic combination of *Heyndrickxia coagulans* and *Lactocaseibacillus casei* on healthy human gut microbiota using the TripleSHIME® system. *Microbiological Research*, 285, 127778. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2024.127778>
- Hammes, W. P., & Hertel, C. (1998). New developments in meat starter cultures. *Meat Science*, 49(SUPPL. 1). [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(98\)90043-2](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(98)90043-2)
- Hugas, M., & Monfort, J. M. (1997). Bacterial starter cultures for meat fermentation. *Food Chemistry*, 59(4). [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00005-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00005-8)
- Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A., & Rozès, N. (2012). Lactic acid bacteria from fermented table olives. In *Food Microbiology* (Vol. 31, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.01.006>
- ISAPP. (2023, August 10). *Clarifying the role of metabolites in the postbiotic definition - International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP)*. <https://isappsience.org/clarifying-the-role-of-metabolites-in-the-postbiotic-definition/>
- Jewell, B., & Collins-Thompson, D. L. (1989). Characterization of chloramphenicol resistance in *Lactobacillus plantarum* caTC2. *Current Microbiology*, 19(6). <https://doi.org/10.1007/BF01570879>
- Jin, X., Dong, W., Chang, K., Yan, Y., & Liu, X. (2024). Efficacy of probiotic supplements on Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Complementary Therapies in Medicine*, 82, 103045. <https://doi.org/10.1016/J.CTIM.2024.103045>
- Joerger, M. C., & Klaenhammer, T. R. (1986). Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus*

- helveticus 481. *Journal of Bacteriology*, 167(2), 439–446.
<https://doi.org/10.1128/jb.167.2.439-446.1986>
- Jofré, A., Martín, B., Aymerich, T., Monfort, J., & Garriga, M. (2006). *The Use of Bacteriocins Against Meat-Borne Pathogens* (pp. 371–399).
<https://doi.org/10.1201/9781420017311.ch15>
- Kamarajan, P., Hayami, T., Matte, B., Liu, Y., Danciu, T., Ramamoorthy, A., Worden, F., Kapila, S., & Kapila, Y. (2015). Nisin ZP, a bacteriocin and food preservative, inhibits head and neck cancer tumorigenesis and prolongs survival. *PLoS ONE*, 10(7).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131008>
- Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*.
<https://doi.org/10.1007/BF00399499>
- Kant, R., Blom, J., Palva, A., Siezen, R. J., & de Vos, W. M. (2011). Comparative genomics of *Lactobacillus*. *Microbial Biotechnology*, 4(3). <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00215.x>
- Kaur, B., Balgir, P. P., Mittu, B., Kumar, B., & Garg, N. (2013). Biomedical applications of fermenticin HV6b isolated from *Lactobacillus fermentum* HV6b MTCC10770. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/168438>
- Kaur, B., Garg, N., Sachdev, A., & Kumar, B. (2014). Effect of the oral intake of probiotic *Pediococcus acidilactici* BA28 on *Helicobacter pylori* causing peptic ulcer in C57BL/6 mice models. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(2). <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0585-4>
- Kaya, H. I., & Simsek, O. (2019). Characterization of pathogen-specific bacteriocins from lactic acid bacteria and their application within cocktail against pathogens in milk. *LWT*, 115, 108464. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108464>
- Khalid, K. (2011). An overview of lactic acid bacteria *International Journal of Biosciences (IJB)*. *Journal of Biosciences IJB*, 1(3).
- Kirtonia, K., Salauddin, M., Bharadwaj, K. K., Pati, S., Dey, A., Shariati, M. A., Tilak, V. K., Kuznetsova, E., & Sarkar, T. (2021). Bacteriocin: A new strategic antibiofilm agent in food industries. In *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* (Vol. 36). <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102141>
- Kıvanç, M., & Yapıcı, E. (2015). Kefir as a Probiotic Dairy Beverage: Determination Lactic Acid Bacteria and Yeast. *ETP International Journal of Food Engineering*.
<https://doi.org/10.18178/ijfe.1.1.55-60>
- Korves, T., & Colosimo, M. E. (2009). Controlled vocabularies for microbial virulence factors. In *Trends in Microbiology* (Vol. 17, Issue 7). <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.04.002>
- Kreibich, S., & Hardt, W. D. (2015). Experimental approaches to phenotypic diversity in infection. *Current Opinion in Microbiology*, 27, 25–36.
<https://doi.org/10.1016/J.MIB.2015.06.007>
- Laranjo, M., Elias, M., & Fraqueza, M. J. (2017). The Use of Starter Cultures in Traditional Meat Products. *Journal of Food Quality*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9546026>
- Li, A., Yang, S., Han, X., Liu, C., Zheng, J., Ma, Y., Cheng, S., Zhao, J., Zhou, W., & Du, P. (2024). Progress of research on the alleviation of intestinal inflammation by regulating

- intestinal mucosal function with postbiotics. *Food Bioscience*, 57, 103437. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2023.103437>
- Liu, C., Zhang, Z. Y., Dong, K., Yuan, J. P., & Guo, X. K. (2009). Antibiotic resistance of probiotic strains of lactic acid bacteria isolated from marketed foods and drugs. *Biomedical and Environmental Sciences*, 22(5). [https://doi.org/10.1016/S0895-3988\(10\)60018-9](https://doi.org/10.1016/S0895-3988(10)60018-9)
- Liu, Y., Zhang, R., Wang, B., Song, S., & Zhang, F. (2024). Evaluation of penicillin-resistance and probiotic traits in *Lactobacillus plantarum* during laboratory evolution. *Gene*, 891. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2023.147823>
- Luh, K. T., Hsueh, P. R., Teng, L. J., Pan, H. J., Chen, Y. C., Lu, J. J., Wu, J. J., & Ho, S. W. (2000). Quinupristin-dalfopristin resistance among gram-positive bacteria in Taiwan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(12). <https://doi.org/10.1128/AAC.44.12.3374-3380.2000>
- Lv, X., Ma, H., Sun, M., Lin, Y., Bai, F., Li, J., & Zhang, B. (2018). A novel bacteriocin DY4-2 produced by *Lactobacillus plantarum* from cutlassfish and its application as bio-preservative for the control of *Pseudomonas fluorescens* in fresh turbot (*Scophthalmus maximus*) fillets. *Food Control*, 89, 22–31. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2018.02.002>
- Malheiros, P. S., Sant'Anna, V., Todorov, S. D., & Franco, B. D. G. M. (2015). Optimization of growth and bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* subsp. *Sakei* 2a. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(3). <https://doi.org/10.1590/S1517-838246320140279>
- Marty, E., Buchs, J., Eugster-Meier, E., Lacroix, C., & Meile, L. (2012). Identification of staphylococci and dominant lactic acid bacteria in spontaneously fermented Swiss meat products using PCR-RFLP. *Food Microbiology*, 29(2). <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.09.011>
- Mathur, S., & Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - A review. *International Journal of Food Microbiology*, 105(3), 281–295. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.008>
- Miranda-Castilleja, D. E., Martínez-Peniche, R. Á., Aldrete-Tapia, J. A., Soto-Muñoz, L., Iturriaga, M. H., Pacheco-Aguilar, J. R., & Arvizu-Medrano, S. M. (2016). Distribution of Native Lactic Acid Bacteria in Wineries of Queretaro, Mexico and Their Resistance to Wine-Like Conditions. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01769>
- Morandi, S., Silveti, T., Vezzini, V., Morozzo, E., & Brasca, M. (2020). How we can improve the antimicrobial performances of lactic acid bacteria? A new strategy to control *Listeria monocytogenes* in Gorgonzola cheese. *Food Microbiology*, 90, 103488. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2020.103488>
- Muñoz-Atienza, E., Gómez-Sala, B., Araújo, C., Campanero, C., Del Campo, R., Hernández, P. E., Herranz, C., & Cintas, L. M. (2013). Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of Lactic Acid Bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture. *BMC Microbiology*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-15>
- Muñoz, M., Mosquera, A., Alméciga-Díaz, C. J., Melendez, A. P., & Sánchez, O. F. (2012). Fructooligosaccharides metabolism and effect on bacteriocin production in *Lactobacillus* strains isolated from ensiled corn and molasses. *Anaerobe*, 18(3), 321–330. <https://doi.org/10.1016/J.ANAEROBE.2012.01.007>
- Muyanja, C. M. B. K., Narvhus, J. A., Treimo, J., & Langsrud, T. (2003). Isolation,

- characterisation and identification of lactic acid bacteria from bushera: A Ugandan traditional fermented beverage. *International Journal of Food Microbiology*, 80(3). [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00148-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00148-4)
- Nilchian, Z., Sharifan, A., Rahimi, E., & Abadi, N. M. (2016). Improvement of Fermented Cucumber Characteristics by Starter Culture of *Lactobacillus plantarum*, *L. bulgaricus* and *S. thermophiles*. In *Journal of Food Biosciences and Technology* (Vol. 6, Issue 2).
- Palla, M., Cristani, C., Giovannetti, M., & Agnolucci, M. (2017). Identification and characterization of lactic acid bacteria and yeasts of PDO Tuscan bread sourdough by culture dependent and independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, 250. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.03.015>
- Parente, E., & Cogan, T. M. (2004). Starter Cultures: General Aspects. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (Vol. 1, pp. 123–147). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S1874-558X\(04\)80065-4](https://doi.org/10.1016/S1874-558X(04)80065-4)
- Parlindungan, E., Dekiwadia, C., & Jones, O. A. H. (2021). Factors that influence growth and bacteriocin production in *Lactiplantibacillus plantarum* B21. *Process Biochemistry*, 107. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.05.009>
- Pei, J., Jin, W., Abd El-Aty, A. M., Baranenko, D. A., Gou, X., Zhang, H., Geng, J., Jiang, L., Chen, D., & Yue, T. (2020). Isolation, purification, and structural identification of a new bacteriocin made by *Lactobacillus plantarum* found in conventional kombucha. *Food Control*, 110, 106923. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106923>
- Pessione, A., Lamberti, C., & Pessione, E. (2010). Proteomics as a tool for studying energy metabolism in lactic acid bacteria. *Molecular BioSystems*, 6(8), 1419–1430. <https://doi.org/10.1039/C001948H>
- Potes, M. E. (2000). *Microbiologia Do Queijo Artesanal Produzido Na Região De Évora*. Universidade de Évora.
- Prete, R., Alam, M. K., Perpetuini, G., Perla, C., Pittia, P., & Corsetti, A. (2021). Lactic Acid Bacteria Exopolysaccharides Producers: A Sustainable Tool for Functional Foods. *Foods*, 10(7), 1653. <https://doi.org/10.3390/foods10071653>
- Punia Bangar, S., Chaudhary, V., Singh, T. P., & Özogul, F. (2022). Retrospecting the concept and industrial significance of LAB bacteriocins. *Food Bioscience*, 46, 101607. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2022.101607>
- Qiao, S., Lv, C., Zhang, X., Lv, X., Yang, D., & Zhao, J. (2024). Antioxidant and anti-stress properties of postbiotics produced by *Lysinibacillus macroides* G117. *Comparative Immunology Reports*, 6, 200143. <https://doi.org/10.1016/J.CIREP.2024.200143>
- Rao Thumu, S. C., & Halami, P. M. (2012). Presence of erythromycin and tetracycline resistance genes in lactic acid bacteria from fermented foods of Indian origin. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 102(4). <https://doi.org/10.1007/s10482-012-9749-4>
- Remiger, A., Ehrmann, M. A., & Vogel, R. F. (1996). Identification of Bacteriocin-Encoding Genes in *Lactobacilli* by Polymerase Chain Reaction (PCR). *Systematic and Applied Microbiology*, 19(1), 28–34. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(96\)80005-1](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(96)80005-1)
- Rivas, F. P., Cayré, M. E., Campos, C. A., & Castro, M. P. (2018). Natural and artificial casings as bacteriocin carriers for the biopreservation of meats products. *Journal of Food Safety*,

38(1). <https://doi.org/10.1111/jfs.12419>

- Rizzello, C. G., De Angelis, M., Coda, R., & Gobbetti, M. (2006). Use of selected sourdough lactic acid bacteria to hydrolyze wheat and rye proteins responsible for cereal allergy. *European Food Research and Technology*, 223(3), 405–411. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-0220-x>
- Roldán-Pérez, S., Gómez Rodríguez, S. L., Sepúlveda-Valencia, J. U., Ruiz Villadiego, O. S., Márquez Fernández, M. E., Montoya Campuzano, O. I., & Durango-Zuleta, M. M. (2023). Assessment of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from an artisanal Colombian cheese. *Heliyon*, 9(11). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e21558>
- Rossi, F., Amadoro, C., & Colavita, G. (2019). Members of the lactobacillus genus complex (LGC) as opportunistic pathogens: A review. In *Microorganisms* (Vol. 7, Issue 5). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050126>
- Saez-Lara, M. J., Gomez-Llorente, C., Plaza-Diaz, J., & Gil, A. (2015). The role of probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria in the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and other related diseases: A systematic review of randomized human clinical trials. In *BioMed Research International* (Vol. 2015). <https://doi.org/10.1155/2015/505878>
- Saithong, P., Panthavee, W., Boonyaratanakornkit, M., & Sikkhamondhol, C. (2010). Use of a starter culture of lactic acid bacteria in plaa-som, a Thai fermented fish. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(5). <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.06.004>
- Samelis, J., Roller, S., & Metaxopoulos, J. (1994). Sakacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* isolated from Greek dry fermented sausages. *Journal of Applied Bacteriology*, 76(5). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb01105.x>
- Santamarina-García, G., Amores, G., Llamazares, D., Hernández, I., Javier R. Barron, L., & Virto, M. (2024). Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistances reveals the effect of the production chain in reducing resistant lactic acid bacteria in an artisanal raw ewe milk PDO cheese. *Food Research International*, 187, 114308. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2024.114308>
- Settanni, L., Barbaccia, P., Bonanno, A., Ponte, M., Di Gerlando, R., Franciosi, E., Di Grigoli, A., & Gaglio, R. (2020). Evolution of indigenous starter microorganisms and physicochemical parameters in spontaneously fermented beef, horse, wild boar and pork salamis produced under controlled conditions. *Food Microbiology*, 87, 103385. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2019.103385>
- Shentu, H., Ye, P., Zhou, Q., Li, P., & Gu, Q. (2023). Purification, characterization, and mode of action of Sakacin ZFM225, a novel bacteriocin from *Lactobacillus sakei* ZFM225. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 35, 101494. <https://doi.org/10.1016/J.BBREP.2023.101494>
- Skyttä, E., Haikara, A., & Mattila-Sandholm, T. (1993). Production and characterization of antibacterial compounds produced by *Pediococcus damnosus* and *Pediococcus pentosaceus*. *Journal of Applied Bacteriology*, 74(2), 134–142. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb03006.x>
- Song, D.-F., Zhu, M.-Y., & Gu, Q. (2014). Purification and characterization of Plantaricin ZJ5, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ZJ5. *PloS One*, 9(8), e105549. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105549>
- Talon, R., Lebert, I., Lebert, A., Leroy, S., Garriga, M., Aymerich, T., Drosinos, E. H., Zanardi,

- E., Ianieri, A., Fraqueza, M. J., Patarata, L., & Lauková, A. (2007). Traditional dry fermented sausages produced in small-scale processing units in Mediterranean countries and Slovakia. 1: Microbial ecosystems of processing environments. *Meat Science*. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.05.006>
- Teusink, B., & Molenaar, D. (2017). Systems biology of lactic acid bacteria: For food and thought. *Current Opinion in Systems Biology*, 6, 7–13. <https://doi.org/10.1016/J.COISB.2017.07.005>
- TLJ Verellen, Geert Bruggeman, CA Van Reenen, LMT Dicks, & Erick Vandamme. (1998). Fermentation optimization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 423. *JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING*, 86(2), 174–179.
- Todorov, S. D., & Dicks, L. M. T. (2006). Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria: Comparison of the bacteriocins. *Process Biochemistry*, 41(1), 11–19. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2005.01.026>
- Todorov, S.D., Furtado, D. N., Saad, S. M. I., Tome, E., & Franco, B. D. G. M. (2011). Potential beneficial properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology*, 110(4), 971–986. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04950.x>
- Todorov, Svetoslav D., & Dicks, L. M. T. (2007). Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* ST712BZ isolated from boza. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(1), 166–172. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000100034>
- Todorov, Svetoslav D. (2009). BACTERIOCINS FROM LACTOBACILLUS PLANTARUM – PRODUCTION , GENETIC ORGANIZATION AND MODE OF ACTION Class I: Lantibiotics. *Journal of Microbiology*, 209–221.
- Todorov, Svetoslav Dimitrov, Perin, L. M., Carneiro, B. M., Rahal, P., Holzapfel, W., & Nero, L. A. (2017). Safety of *Lactobacillus plantarum* ST8Sh and Its Bacteriocin. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 9(3). <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9260-3>
- Todorov, Svetoslav Dimitrov, Stojanovski, S., Iliev, I., Moncheva, P., Nero, L. A., & Ivanova, I. V. (2017). Technology and safety assessment for lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian fermented meat product “lukanka.” *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(3). <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.02.005>
- Todorov, Svetoslav Dimitrov, van Reenan, C. A., & Dicks, L. M. T. (2004). Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST13BR, a strain isolated from barley beer. *Journal of General and Applied Microbiology*, 50(3). <https://doi.org/10.2323/jgam.50.149>
- Toshimitsu, T., Gotou, A., Sashihara, T., Hachimura, S., Shioya, N., Suzuki, S., & Asami, Y. (2020). Effects of 12-Week Ingestion of Yogurt Containing *Lactobacillus plantarum* OLL2712 on Glucose Metabolism and Chronic Inflammation in Prediabetic Adults: A Randomized Placebo-Controlled Trial. *Nutrients*, 12(2), 374. <https://doi.org/10.3390/nu12020374>
- Vaughan, A., Eijsink, V. G. H., & Van Sinderen, D. (2003). Functional Characterization of a Composite Bacteriocin Locus from Malt Isolate *Lactobacillus sakei* 5. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7194–7203. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7194-7203.2003>

- Verluyten, J., Messens, W., & De Vuyst, L. (2004). Sodium Chloride Reduces Production of Curvacin A, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus curvatus* Strain LTH 1174, Originating from Fermented Sausage. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4). <https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.2271-2278.2004>
- Wakil, S. M., Laba, S. A., & Fasiku, S. A. (2014). Isolation and identification of antimicrobial-producing lactic acid bacteria from fermented cucumber. *African Journal of Biotechnology*, 13(25). <https://doi.org/10.5897/ajb2014.13704>
- Wang, Y., Zhan, H., Saif, A., Zhang, X., & Su, H. (2024). Analysis of winter survival strategies of sympatric black-necked cranes, and common cranes from the perspective of diet and gut microbiota. *Ecological Indicators*, 160, 111782. <https://doi.org/10.1016/J.ECOLIND.2024.111782>
- Xiao-hang, Q., Si-yue, C., & Hui-dong, T. (2024). Multi-strain probiotics ameliorate Alzheimer's-like cognitive impairment and pathological changes through the AKT/GSK-3 β pathway in senescence-accelerated mouse prone 8 mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 119, 14–27. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2024.03.031>
- Yang, Y., Yang, L., Wu, J., Hu, J., Wan, M., Bie, J., Li, J., Pan, D., Sun, G., & Yang, C. (2024). Optimal probiotic combinations for treating nonalcoholic fatty liver disease: A systematic review and network meta-analysis. *Clinical Nutrition*, 43(6), 1224–1239. <https://doi.org/10.1016/J.CLNU.2024.04.004>
- Zago, M., Fornasari, M. E., Carminati, D., Burns, P., Suàrez, V., Vinderola, G., Reinheimer, J., & Giraffa, G. (2011). Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiology*, 28(5). <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.02.009>
- Zagorec, M., & Champomier-Vergès, M.-C. (2017). *Lactobacillus sakei*: A Starter for Sausage Fermentation, a Protective Culture for Meat Products. *Microorganisms*, 5(3), 56. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030056>
- Zhang, W., Guo, H., Cao, C., Li, L., Kwok, L. Y., Zhang, H., & Sun, Z. (2017). Adaptation of *Lactobacillus casei* Zhang to gentamycin involves an alkaline shock protein. *Frontiers in Microbiology*, 8(NOV). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02316>
- Zhang, Yulin, Yang, H., Huang, R., Wang, X., Ma, C., & Zhang, F. (2022). Effects of *Lactiplantibacillus plantarum* and *Lactiplantibacillus brevis* on fermentation, aerobic stability, and the bacterial community of paper mulberry silage. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1063914>
- Zhang, Yulong, Hu, P., Xie, Y., & Wang, X. (2020). Co-fermentation with *Lactobacillus curvatus* LAB26 and *Pediococcus pentosaceus* SWU73571 for improving quality and safety of sour meat. *Meat Science*, 170. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108240>
- Zhao, D., Wang, Q., Lu, F., Bie, X., Zhao, H., Lu, Z., & Lu, Y. (2022). A novel plantaricin 827 effectively inhibits *Staphylococcus aureus* and extends shelf life of skim milk. *LWT*, 154. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112849>
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>

Zonenschain, D., Rebecchi, A., & Morelli, L. (2009). Erythromycin- and tetracycline-resistant lactobacilli in Italian fermented dry sausages. *Journal of Applied Microbiology*, 107(5). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04338.x>

A. Materiais suplementares

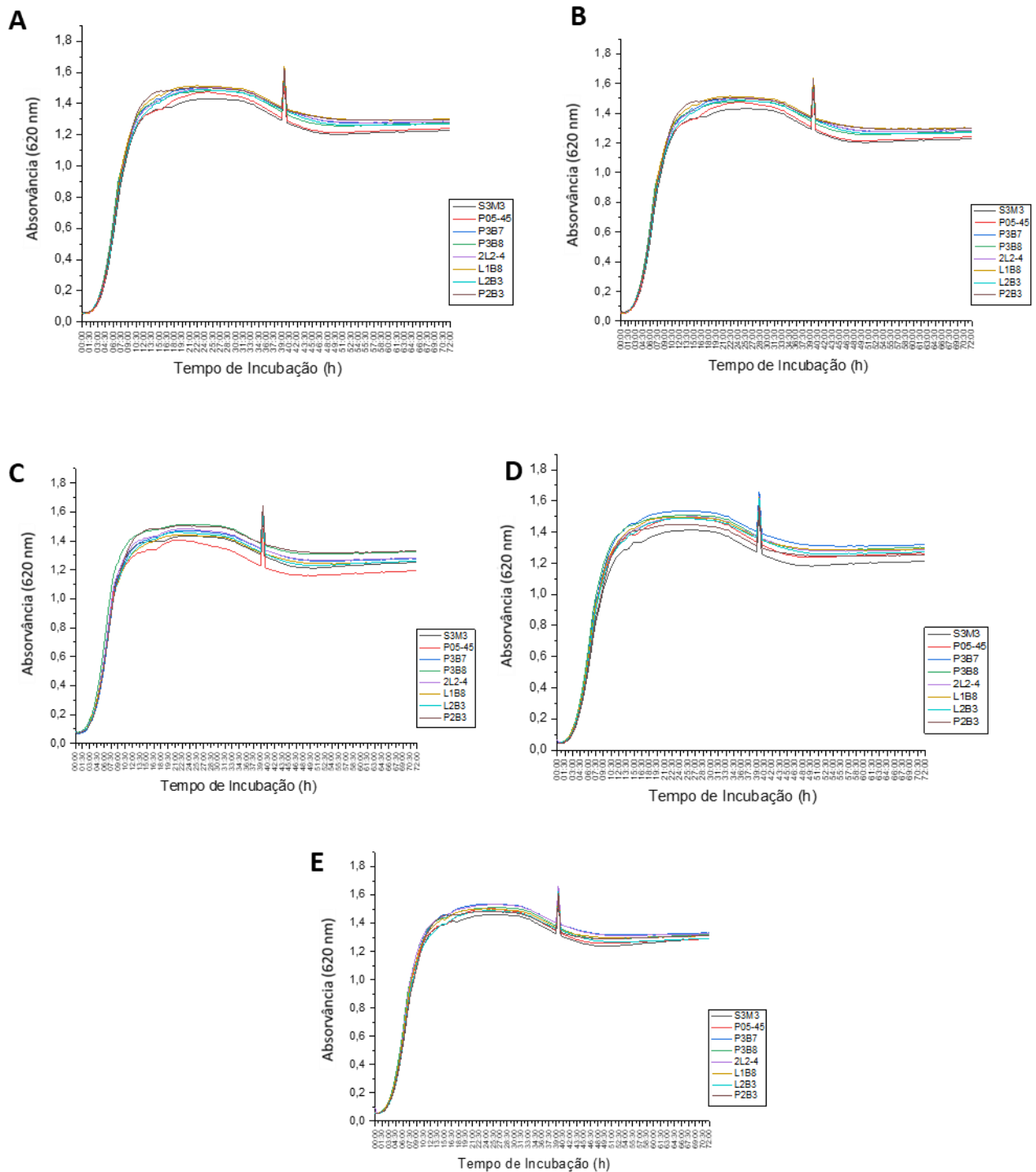


Figura A.1 - Curvas de Crescimento a 20°C e pH inicial = 5,8 (A – MRS não suplementado; B - MRS com extrato de carne 15 g/; C - MRS com extrato de carne 20 g/L; D - MRS suplementado com Vitamina B; E - MRS suplementado com Ferro)

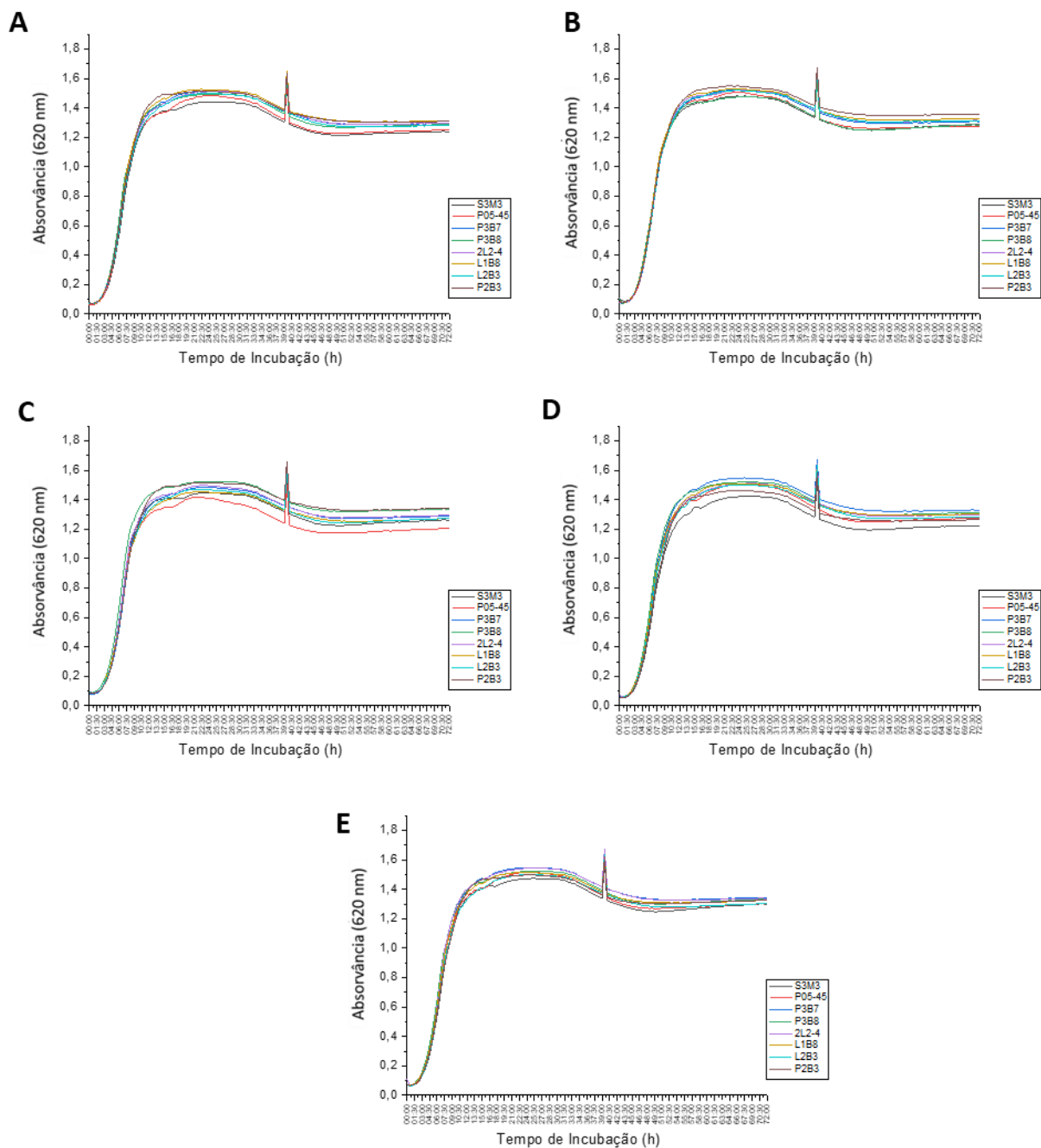


Figura A.2 - Curvas de Crescimento a 20°C e pH inicial =6,3 (A – MRS não suplementado; B - MRS com extrato de carne 15 g/L; C - MRS com extrato de carne 20 g/L; D - MRS suplementado com Vitamina B; E - MRS suplementado com Ferro)

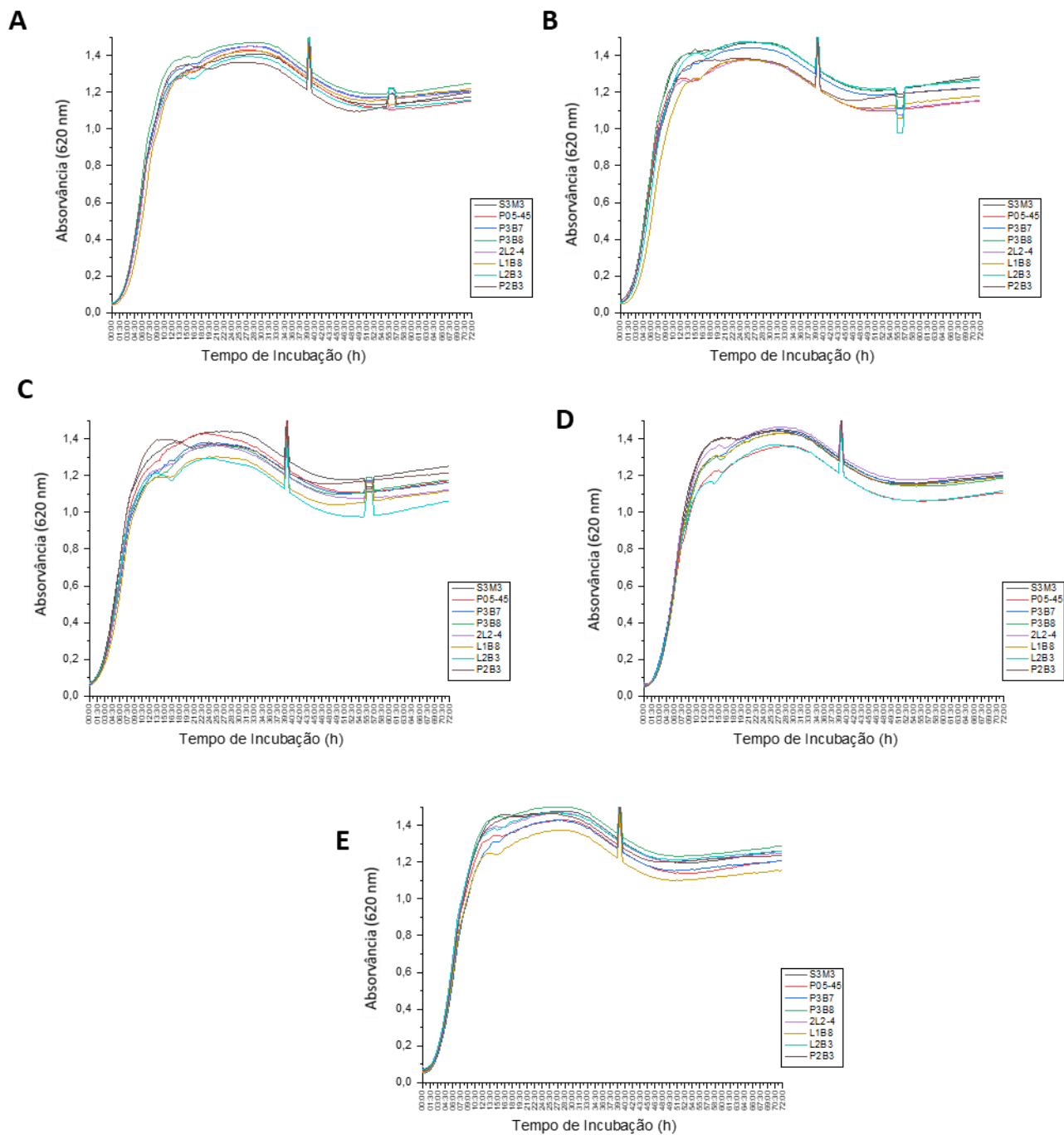


Figura A.3 - Curvas de Crescimento a 30°C e pH inicial =6,3 (A – MRS não suplementado; B - MRS com extrato de carne 15 g; C - MRS com extrato de carne 20 g/L; D - MRS suplementado com Vitamina B; E - MRS suplementado com Ferro)

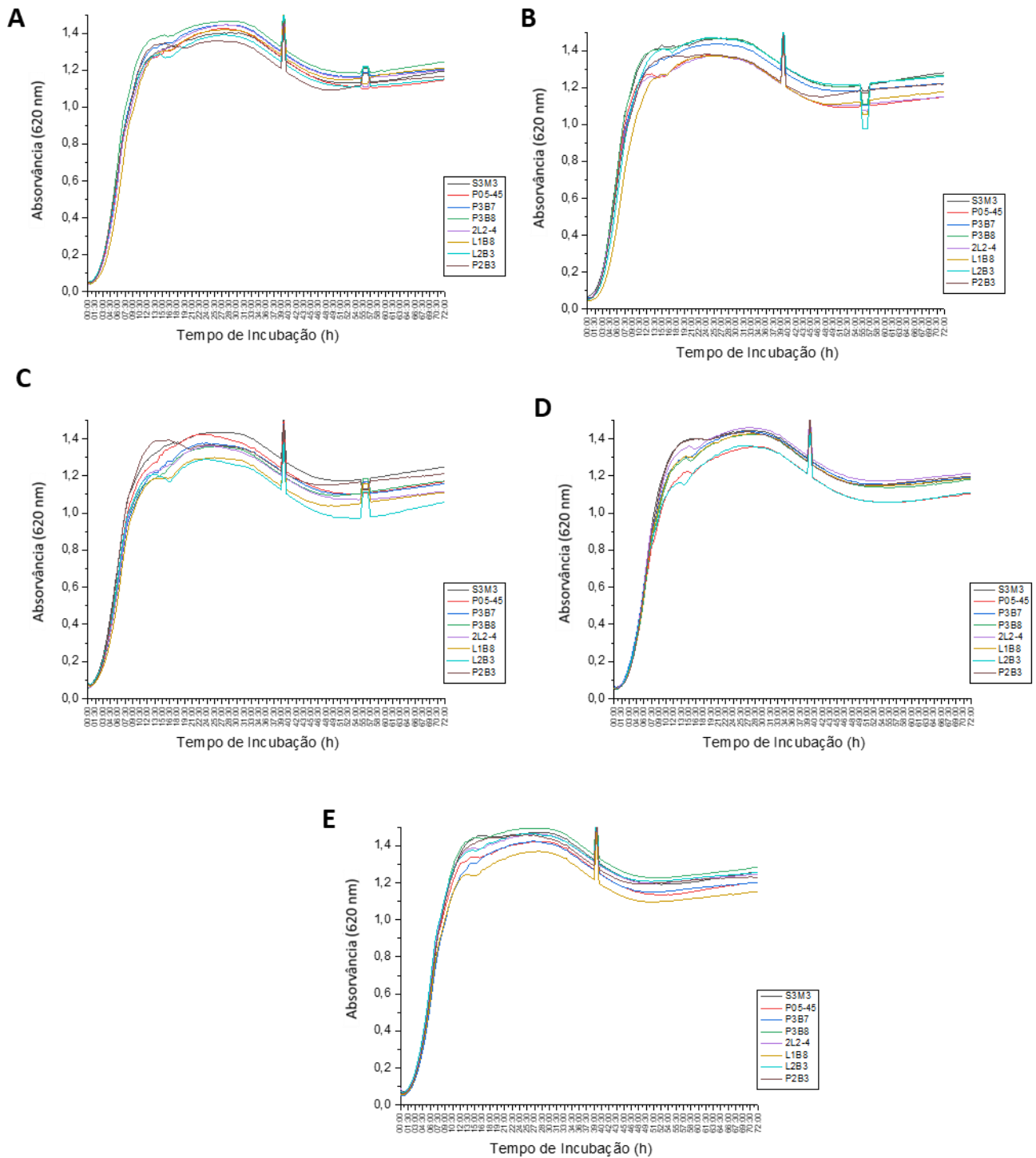


Figura A.4 - Curvas de Crescimento a 30°C e pH inicial =5,8 (A – MRS não suplementado; B - MRS com extrato de carne 15 g/L; C - MRS com extrato de carne 20 g/L; D - MRS suplementado com Vitamina B; E - MRS suplementado com Ferro)