

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA



**Em busca de bacteriófagos para a bioconservação de  
alimentos e bebidas**

Helena Sofia da Piedade Vicente Ferreira

**Mestrado em Microbiologia Aplicada**

Dissertação orientada por:  
Doutor Frédéric Bustos Gaspar  
Professora Doutora Filipa Vale



**iBET**

O trabalho apresentado nesta Dissertação de Mestrado foi realizado no iBET- Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica sob a orientação direta do Doutor Frédéric Bustos Gaspar

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

## Agradecimentos

Queria começar por agradecer ao Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica, mais especificamente ao laboratório Microbiology and Molecular Biology da Divisão Sustainability for Food & Health, onde realizei o meu trabalho de dissertação, que foi inserido num projeto exploratório, phages4ACB, financiado pela FCT. Gostaria de agradecer à Teresa, chefe do laboratório e a todos, sem exceção, pela forma acolhedora e prestativa como me receberam, desde o primeiro dia. Foi um ano desafiante, mas sentir que fazia parte de uma equipa, que me daria suporte em qualquer dificuldade, fez toda a diferença.

Um especial agradecimento ao meu orientador, Frédéric Gaspar, por ter confiado em mim desde o início. Pelo suporte, encorajamento, disponibilidade e boa disposição. Agradeço por toda a atenção dada, ao longo destes dois intensos anos, pela forma como me fez encarar a ciência, as múltiplas possibilidades que a mesma possui e, sobretudo, pela resiliência que a mesma exige.

Ao Carlos São José, investigador da iMed.Ulisboa, um agradecimento pela ajuda, conhecimento transmitido em todas as reuniões e pela simpatia e disponibilidade sempre demonstradas.

À Inês Leonardo, o meu suporte diário no laboratório, que esteve sempre de braço dado comigo, a guiar-me pelo melhor caminho, a vibrar com as minhas conquistas e a mostrar-me que para atingir a excelência é preciso trabalho e muita dedicação.

À professora, Filipa Vale, orientadora interna da FCUL, obrigada pela disponibilidade, preocupação e por me ter sempre posto à vontade para lhe pedir ajuda em qualquer coisa que eu precisasse.

À Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, onde está inserido o mestrado em microbiologia aplicada. Não foi um início fácil, mas saio da faculdade com o dobro do conhecimento que tinha quando entrei, e com uma outra visão sobre o que é fazer ciência.

A nível pessoal, agradeço aos meus colegas e amigos, em especial ao Gui que partilhou comigo esta etapa no iBET, tornando-a mais familiar, divertida e aconchegante. A todos os outros que sempre me apoiaram e encorajaram a seguir em frente, nos momentos em que eu mais duvidava de mim própria e, sobretudo, entenderam a falta de disponibilidade, em muitos momentos.

Por fim, mas não menos importante, uma grande obrigada à minha família, em especial à minha mãe, por toda a dedicação, preocupação e força dada em todas as etapas, não só na realização da dissertação, como na minha vida académica. Foram todos a principal força motriz para que esta fase da minha vida fosse concretizada.

Viva à Microbiologia!

## Resumo

A indústria de sumos de fruta tem enfrentado incidentes crescentes de deterioração atribuídos a bactérias do género *Alicyclobacillus*. Estas bactérias esporuladas produzem compostos responsáveis por odores e sabores indesejáveis, comprometendo a qualidade do produto, provocando desperdício alimentar, perdas económicas e reduzindo a confiança dos consumidores. A resistência das bactérias do género *Alicyclobacillus* a ambientes ácidos e a processos de pasteurização utilizados na indústria alimentar justifica a procura de novas estratégias de biopreservação. Entre estas, os bacteriófagos surgem como alternativa promissora, segura, ecológica e sustentável.

Neste trabalho foram aplicadas metodologias de isolamento, purificação e amplificação de bacteriófagos a partir de diferentes amostras ambientais consideradas potenciais reservatórios de *Alicyclobacillus* e de fagos associados. Das amostras testadas, apenas uma, proveniente de solo de vinha, originou placas fágicas, utilizando *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3922<sup>T</sup> como hospedeira. A utilização da estirpe alternativa *A. acidoterrestris* TAB 21 revelou-se essencial para o processo de purificação, permitindo a obtenção de isolados fágicos após sucessivos ciclos de seleção. Foram ainda testadas diferentes condições para otimizar a difusão, recuperação, estabilidade e manutenção da atividade infecciosa do fago. O meio líquido BAT, um meio de cultura desenvolvido para o crescimento de *A. acidoterrestris*, a pH 4 e a 45 °C revelou-se o mais adequado para preservar a sua viabilidade. O método de inundação de placas possibilitou a obtenção de títulos elevados, permitindo a extração e purificação de ácidos nucleicos, confirmados como sendo DNA de dupla cadeia íntegro com recurso a espectrofotometria, fluorometria e eletroforese em gel.

Palavras-chave: género *Alicyclobacillus*; deterioração; biopreservação; bacteriófagos.

## Abstract

The fruit juice industry has faced increasing incidents of spoilage attributed to bacteria of the genus *Alicyclobacillus*. These spore-forming bacteria produce compounds responsible for undesirable odours and flavours, compromising product quality, causing food waste, economic losses, and reducing consumer confidence. The resistance of *Alicyclobacillus* to acidic environments and to pasteurisation processes used in the food industry justifies the search for new biopreservation strategies. Among these, bacteriophages emerge as a promising, safe, ecological, and sustainable alternative.

In this work, methodologies for the isolation, purification and amplification of bacteriophages were applied using different environmental samples considered potential reservoirs of *Alicyclobacillus* and associated phages. Of the samples tested, only one, originating from vineyard soil, produced phage plaques when using *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3922<sup>T</sup> as the host. Phage purification was only possible using the alternative strain *A. acidoterrestris* TAB 21, which enabled the recovery of isolated phage plaques after successive purification cycles. Different conditions were also tested to optimise diffusion, recovery, stability, and maintenance of the phage's infectious activity. Liquid BAT medium, a culture medium developed for the growth of *A. acidoterrestris*, at pH 4 and 45 °C proved to be the most suitable for preserving its viability. The plate flooding method allowed the obtainment of high titres, allowing for the extraction and purification of nucleic acids, confirmed as intact double-stranded DNA through spectrophotometry, fluorometry and gel electrophoresis.

Keywords: *Alicyclobacillus* genus; spoilage; biopreservation; bacteriophages.

# Índice

<b>Agradecimentos</b> .....	<b>i</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>ii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>iii</b>
<b>Índice</b> .....	<b>iv</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>vi</b>
<b>Lista de Tabelas</b> .....	<b>vii</b>
<b>Lista de Abreviaturas e Siglas</b> .....	<b>viii</b>
<b>1 Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1 Segurança e qualidade alimentar .....	1
1.1.1 Segurança alimentar .....	1
1.1.2 Qualidade alimentar .....	2
1.2 <i>Alicyclobacillus</i> e a qualidade alimentar .....	3
1.2.1 Impacto de <i>Alicyclobacillus</i> na indústria alimentar .....	3
1.2.2 O género <i>Alicyclobacillus</i> .....	4
1.2.3 Características fenotípicas do género <i>Alicyclobacillus</i> .....	5
1.3 Métodos de conservação contra <i>Alicyclobacillus</i> .....	7
1.3.1 Conservação física .....	7
1.3.2 Conservação química .....	7
1.3.3 Conservação biológica .....	8
1.4 Bacteriófagos como meio de biocontrolo .....	8
1.4.1 Definição e características .....	8
1.4.2 Ciclo lisogénico e lítico .....	9
1.4.3 Bacteriófagos como bioconservantes na indústria alimentar .....	9
1.5 Objetivos .....	10
<b>2 Materiais e Métodos</b> .....	<b>11</b>
2.1 Estirpes bacterianas, meios de cultura e amostras ambientais .....	11
2.1.1 Estirpes bacterianas .....	11
2.1.2 Meios de cultura .....	12
2.1.3 Amostras ambientais .....	12
2.2 Métodos de microbiologia convencional .....	13
2.2.1 Condições gerais de crescimento .....	13
2.2.2 Processamento de amostras ambientais .....	14
2.2.3 Incubação de amostras ambientais .....	14
2.2.4 Detecção de bacteriófagos por técnica de dupla camada em placa de agar .....	15
2.2.5 Purificação de bacteriófagos .....	15

	Amplificação de bacteriófagos .....	16
2.2.6	16	
2.2.7	Determinação do título fágico .....	16
2.2.8	Obtenção de suspensão de fagos concentrada .....	17
2.3	Métodos moleculares.....	17
2.3.1	Extração de ácidos nucleicos.....	17
2.3.2	Análise de pureza, quantificação e visualização .....	17
<b>3</b>	<b>Resultados e Discussão .....</b>	<b>19</b>
3.1	Isolamento de bacteriófagos .....	19
3.2	Purificação de placas fágicas.....	21
3.3	Amplificação de bacteriófagos .....	23
3.4	Cálculo do título fágico e obtenção de suspensão de fagos concentrada .....	25
3.5	Extração de ácidos nucleicos.....	26
<b>4</b>	<b>Conclusões e Perspetivas Futuras .....</b>	<b>29</b>
<b>5</b>	<b>Referências.....</b>	<b>31</b>

## Lista de Figuras

- Figura 3.1** - Isolamento de bacteriófagos a partir da Amostra 4 (solo de vinha) enriquecida, utilizando a estirpe *A. acidoterrestris* DSM 3922<sup>T</sup>. Subsequente tentativa de purificação de fagos utilizando a mesma estirpe hospedeira (DSM 3922<sup>T</sup>) e a estirpe TAB 21..... 21
- Figura 3.2** - Avaliação das condições de difusão de fagos por “spot plating” com a estirpe TAB. 21. SF – Sem filtração; F – Com filtração ..... 22
- Figura 3.3** - Efeito das condições de crescimento (meio, pH, temperatura e agitação) na recuperação de fagos, em ensaios de dupla camada em placa de agar. TA – Temperatura ambiente; c/a - com agitação; s/a - sem agitação. .... 23
- Figura 3.4** - Exemplos de placas "webbed" obtidas após difusão e infecção fágica. (A) Placa parcialmente infetada, apresentando regiões com crescimento bacteriano residual, considerada mais adequada para o processo de inundação. (B) Placa completamente confluyente..... 25

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 2.1</b> - Espécie, origem, produção de guaiacol e número das estirpes utilizadas no presente trabalho. +: produção de guaiacol; -: não produção de guaiacol. ....	11
<b>Tabela 2.2</b> - Origem, código e data de recolha das amostras ambientais utilizadas no presente trabalho. ....	13
<b>Tabela 3.1</b> - Detecção de placas fágicas após ensaio de dupla camada em placa de agar com amostras ambientais processadas e não enriquecidas, utilizando diferentes estirpes hospedeiras. ....	19
<b>Tabela 3.2</b> - Detecção de placas fágicas após ensaio de dupla camada em placa de agar com amostras ambientais processadas e enriquecidas, utilizando diferentes estirpes hospedeiras. Amostras incubadas em meio BAT líquido, a 43 °C durante 6 h. ....	20
<b>Tabela 3.3</b> - Detecção de placas fágicas após ensaio de dupla camada em placa de agar com amostras ambientais incubadas sem processamento prévio, utilizando diferentes estirpes hospedeiras. Amostras incubadas em meio BAT líquido, à temperatura ambiente, durante 24 h. ....	21
<b>Tabela 3.4</b> - Concentração de partículas fágicas (UFP/mL) em diferentes soluções diluentes e condições de pH, determinada no momento da recuperação (t0) e após 14 dias de armazenamento a 4°C (t14)..	24
<b>Tabela 3.5</b> - Determinação do título fágico do lisado obtido a partir de placas "webbed" e do sobrenadante resultante do processo de concentração por centrifugação.....	25
<b>Tabela 3.6</b> - Títulos fágicos determinados para as três frações resultantes do processo de concentração e preparação para extração de ácidos nucleicos. Descartado I – Volume resultante da lavagem do tubo da centrifugação noturna; Descartado II – “pellet” resultante da nova centrifugação; Amostra I – Sobrenadante resultante da nova centrifugação. ....	26
<b>Tabela 3.7</b> - Quantificação e avaliação da pureza de ácidos nucleicos extraídos de frações de bacteriófagos. Os valores representam a concentração determinada por Qubit dsDNA e NanoDrop, bem como as razões 260 nm/280 nm e 260 nm/230 nm, utilizadas para avaliação da pureza das amostras.	27

## **Lista de Abreviaturas e Siglas**

**ATCC** – Coleção Americana de Culturas Tipo, do inglês “American Type Culture Collection”

**BAM** – meio de crescimento desenvolvido para o crescimento de *Bacillus acidocaldarius*

**BAT** – meio de crescimento desenvolvido para o crescimento de *Bacillus acidoterrestris*

**C** – citosina

**DNA** – ácido desoxirribonucleico

**DNase** – desoxirribonuclease

**DO** – densidade ótica

**DSMZ** – Coleção Alemã de Microrganismos e Culturas Celulares, do alemão “Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen”

**D** – tempo de redução decimal

**EDTA** – ácido etilendiamino tetra-acético

**EUA** – Estados Unidos da América

**EFSA** – Autoridade Europeia para Segurança dos Alimentos, do inglês “European Food Safety Authority”

**FAO** – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, do inglês “Food and Agriculture Organization”

**FDA** – Administração de Alimentos e Medicamentos, do inglês “Food and Drug Administration”

**G** – guanina

**HHP** – Alta Pressão Hidrostática, do inglês “High Hydrostatic Pressure”

**HPP** – Processamento por Alta Pressão, do inglês “High Pressure Processing”

**IFO** – Instituto de Fermentação de Osaka, do inglês “Institute for Fermentation, Osaka”

**iBET** – Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica (Portugal)

**OSA** – meio de crescimento sólido composto por soro de laranja, do inglês “Orange Serum Agar”

**PEF** – Campo Elétrico Pulsado, do inglês “Pulsed Electric Field”

**PDA** – meio de crescimento sólido composto por batata e dextrose, do inglês “Potato Dextrose Agar”

**PES** – polietersulfona

**RNA** – ácido ribonucleico

**RNase** – ribonuclease

**STEC** – *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga, do inglês “Shiga toxin-producing *Escherichia coli*”

**T** – estirpe tipo

**TAE** – Tris-Acetato EDTA

**UFP** – unidades formadoras de placas

**UE** – União Europeia

**UV-C** – ultravioleta tipo C

**UV-Vis** – ultravioleta-visível

**ssDNA BR** – DNA de cadeia simples (gama ampla), do inglês “Single-stranded DNA Broad Range”

**dsDNA BR** – DNA de dupla cadeia (gama ampla), do inglês “Double-stranded DNA Broad Range”

**WHO** – Organização Mundial da Saúde, do inglês “World Health Organization”

**YSG** – meio de crescimento composto por extrato de levedura, amido e glucose, do inglês “Yeast Starch Glucose”

# 1 Introdução

## 1.1 Segurança e qualidade alimentar

Os conceitos de segurança e qualidade dos alimentos, são de extrema importância na indústria alimentar, pois afetam a saúde e o bem-estar dos consumidores. Ambos podem ser comprometidos por vários tipos de fenómenos. Fenómenos estes, que podem ser caracterizados como contaminações biológicas, químicas e físicas. No entanto, ao longo do presente trabalho, o foco será no campo das contaminações microbiológicas.

### 1.1.1 Segurança alimentar

Desde os primórdios da humanidade, as doenças transmitidas por alimentos têm sido uma realidade constante. Alimentos seguros protegem a saúde pública e garantem o bem-estar nutricional. Em contrapartida, alimentos inseguros podem provocar doenças, algumas das quais podem ser fatais, impactando significativamente os indicadores socioeconómicos de um país (WHO, 2023).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO), anualmente, as doenças transmitidas por alimentos resultam em 600 milhões de casos registados em todo o mundo, afetando uma em cada dez pessoas. Estima-se que isto resulte em 420 mil mortes anuais, sendo as crianças o grupo mais vulnerável. Estas representam cerca de 30% do total de vidas perdidas devido a doenças transmitidas por alimentos (WHO, 2024).

Alimentos inseguros, contendo bactérias, vírus, parasitas ou fungos, causam mais de 200 doenças, que podem variar entre intoxicações alimentares, diarreias, febres e, em casos graves, complicações sistémicas que podem levar à morte (FAO, 2022). Segundo o relatório de 2022 feito pela Autoridade Europeia para Segurança dos Alimentos (EFSA, do inglês “European Food Safety Authority”), *Campylobacter* spp. foi o principal agente responsável por doenças transmitidas por alimentos, seguida de *Salmonella* spp., *Yersinia* spp. e *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC). O relatório reportou ainda que *Listeria monocytogenes* foi causadora da maior taxa de mortalidade e hospitalizações entre os casos notificados (EFSA, 2023).

Existem outros microrganismos que contribuem grandemente para o impacto global das doenças transmitidas por alimentos, onde estão incluídos o norovírus, o vírus da hepatite A e alguns fungos, tais como *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, capazes de produzir aflatoxina (uma micotoxina) (WHO, 2015; Lianou *et al.*, 2016).

Estes agentes patogénicos podem ser encontrados em alimentos de origem animal, como leite não pasteurizado, ovos, carnes insuficientemente cozinhadas, mas também em produtos de origem vegetal. Em particular, frutas e vegetais crus podem ser contaminados por contacto com água contaminada, solos infetados ou superfícies mal higienizadas durante o manuseamento e processamento (Centers for Disease Control and Prevention, 2025; WHO, 2024).

### 1.1.2 Qualidade alimentar

Outro parâmetro importante do setor alimentar é a qualidade. Esta é amplamente entendida como um conjunto de propriedades e características sensoriais de um produto alimentar, que o tornam desejável e aceitável para o consumidor (Bevilacqua *et al.*, 2017).

Muitas vezes este parâmetro é posto em causa pela presença de microrganismos não patogênicos capazes de deteriorar alimentos. Este fenómeno, designado de deterioração microbiana, é um dos grandes problemas que afetam a qualidade alimentar (Karanth *et al.*, 2023). Geralmente estes alimentos podem ser seguros para consumo, ou seja, não causam doenças porque não existem patógenos ou toxinas presentes, mas afetam as suas características sensoriais (Sahu & Bala, 2017), como a aparência, o sabor, o odor ou o valor nutricional dos produtos alimentares (Lianou *et al.*, 2016; Odeyemi *et al.*, 2020).

Este tipo de deterioração na indústria dos alimentos é uma das principais razões do desperdício alimentar, estimado, segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO, do inglês “Food and Agriculture Organization”), em 1,3 mil milhões de toneladas por ano. Isto corresponde a um terço (FAO, 2011) de todos os alimentos produzidos para consumo humano. Consequentemente, há perdas económicas na ordem dos milhões, associadas à produção e processamento de alimentos, assim como impactos negativos na sustentabilidade ambiental (Petruzzi *et al.*, 2017; Snyder *et al.*, 2024).

Para se perceber como ocorre a deterioração, é fundamental ter, em primeiro lugar, a perceção de que os alimentos são compostos por uma ampla variedade de nutrientes que, combinados com um ambiente favorável, proporcionam condições ideais para o crescimento de microrganismos deteriorantes. Desta forma, o tipo de microrganismo que afeta cada classe de alimento pode variar, dependendo das propriedades intrínsecas do próprio alimento, bem como do ambiente externo em que o mesmo é mantido durante o processamento, armazenamento e distribuição (Karanth *et al.*, 2023; Petruzzi *et al.*, 2017; Taormina *et al.*, 2021).

Dentro destes fatores extrínsecos estão englobados a temperatura, a humidade relativa do ambiente, a exposição à luz, os níveis de contaminação microbiana durante o manuseio ou transporte, a composição da atmosfera na embalagem, os tratamentos térmicos ou físicos subsequentes, assim como o manuseio pelo próprio consumidor (Sousa Gallagher *et al.*, 2011; Taormina *et al.*, 2021). Por outro lado, nos fatores intrínsecos estão incluídos o teor de água, o valor de pH, a disponibilidade de oxigénio, o potencial de redução-oxidação, os nutrientes presentes, a composição bioquímica e a microflora natural (Kong & Singh, 2016; Odeyemi *et al.*, 2020; Taormina *et al.*, 2021).

Devido à totalidade destes fatores, uma ampla variedade de microrganismos pode afetar a qualidade dos alimentos, em que estão incluídos os fungos (bolores e leveduras) e as bactérias.

Os fungos filamentosos, ou bolores, como os géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Mucor* (Bento de Carvalho *et al.*, 2024), destacam-se pela sua capacidade de produzir gás, formar colónias e micélio na superfície dos alimentos. Além disso, estudos indicam que esses fungos podem causar a deterioração de sumos de frutas devido à presença de enzimas pectinolíticas e degradativas (Sourri *et al.*, 2022). Já as leveduras, devido à sua tolerância a condições de baixa atividade de água e stress osmótico, são frequentemente encontradas em produtos com elevada concentração de solutos, como açúcar e sal, bem como em ambientes ácidos ou com baixa disponibilidade de oxigénio, como sumos de frutas, refrigerantes e vinhos. Esses microrganismos não apenas produzem sabores e odores indesejados, como também etanol como subproduto da fermentação, característica comum em géneros como *Candida*,

*Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces* (Lianou *et al.*, 2016; Steele, 2004; Bento de Carvalho *et al.*, 2024).

Relativamente a bactérias, *Pseudomonas* spp. são amplamente relatadas em deteriorações de alimentos crus ou frescos, durante o armazenamento aeróbio, frequentemente identificadas pela produção de odores desagradáveis, que são característicos do processo de deterioração (Lianou *et al.*, 2016). Por outro lado, as bactérias da família *Enterobacteriaceae*, que incluem géneros como *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Citrobacter*, possuem um papel importante na deterioração de vegetais frescos e alimentos de origem animal. Algumas espécies desta família, conhecidas como coliformes, são frequentemente utilizadas como indicadores microbiológicos da qualidade da água e dos alimentos, devido à sua presença comum no trato gastrointestinal de animais de sangue quente, incluindo o ser humano. A sua deteção baseia-se frequentemente na capacidade de fermentar lactose com produção de ácido e gás, uma característica utilizada em métodos laboratoriais para a sua identificação (Sperber, 2009).

Adicionalmente, alguns microrganismos capazes de sobreviver aos processos de pasteurização são responsáveis por sabores indesejáveis em vinhos, leite e sumos de fruta (Lianou *et al.*, 2016; Petruzzi *et al.*, 2017). Entre eles encontram-se géneros como *Bacillus* e *Clostridium* (ambos esporulados) e *Alicyclobacillus*, um género acidófilo e termorresistente, que também contribui para a deterioração alimentar. Este último, é o foco principal do presente trabalho e por isso está caracterizado em maior detalhe no capítulo seguinte.

## 1.2 *Alicyclobacillus* e a qualidade alimentar

### 1.2.1 Impacto de *Alicyclobacillus* na indústria alimentar

A presença de *Alicyclobacillus*, uma bactéria termoacidófila e formadora de esporos, tem sido associada a eventos de deterioração, representando um desafio significativo para os produtores de alimentos, especialmente para a indústria de sumos e outros produtos à base de fruta. Várias espécies de *Alicyclobacillus*, especialmente *Alicyclobacillus acidoterrestris*, foram identificadas como microrganismos deteriorantes em sumos de fruta e bebidas comercialmente pasteurizadas. O primeiro caso foi registado em 1982, na Alemanha, num sumo de maçã pasteurizado (Pornpukdeewattana *et al.*, 2020; Sokołowska *et al.*, 2020). O registo descrito por Cerny *et al.* (1984) caracterizou-se como uma leve turvação no sumo e um sabor desagradável, semelhante ao de desinfetante. Na ocasião, estabeleceu-se uma relação entre o microrganismo isolado do sumo e a espécie *Bacillus acidocaldarius*, tendo mais tarde havido uma revisão taxonómica que alterou o nome da espécie para *A. acidoterrestris*.

A partir desse registo, as bactérias deste género tornaram-se uma grande preocupação para a indústria alimentar de produtos a base de fruta, uma vez que resistem aos ambientes ácidos utilizados na preservação de alimentos; podem formar endósporos que sobrevivem às etapas de pasteurização e a altas temperaturas, podem provocar a germinação dos esporos, fazendo com que as células vegetativas cresçam durante a vida útil dos produtos de consumo (Huertas *et al.*, 2014). Apesar da espécie *A. acidoterrestris* ser a mais frequentemente associada a relatos de deterioração, outras espécies, como *Alicyclobacillus acidiphilus*, *Alicyclobacillus pomorum*, *Alicyclobacillus cycloheptanicus*, *Alicyclobacillus acidocaldarius* e *Alicyclobacillus herbarius*, também têm sido identificadas em incidentes deteriorantes desse tipo (Merle & Montville, 2014).

A ocorrência desses eventos de deterioração está diretamente relacionada à contaminação inicial das matrizes alimentares por *Alicyclobacillus*. A principal fonte desse microrganismo é a matéria-prima – fruta – que pode ter sido previamente contaminada pelo solo, insetos, água, ar ou até mesmo pelo contato humano durante a colheita e o transporte. Durante o processamento da matéria-prima em ambiente fabril, a água condensada em evaporadores, bem como equipamentos e tubagens que não tenham sido devidamente limpos, desinfetados ou esterilizados, podem também constituir importantes fontes de contaminação (Steyn *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2015).

Depois de contaminarem o produto final, estas bactérias, ao contrário de outras, geralmente só são detetadas através de reclamações dos consumidores, dado que a ação das mesmas não produz gás durante o crescimento (nem alterações no pH), o que significa que as embalagens flexíveis não opam, e a contaminação passa despercebida. Deste modo, só é possível detetar as alterações quando o consumidor abre o produto e apercebe-se de um odor e/ou sabor desagradáveis, descritos como medicinal, antisséptico e semelhante a desinfetante (Chang & Kang, 2004), que pode ocorrer ainda antes do prazo de validade terminar (Chang & Kang, 2004; Sokołowska *et al.*, 2020). Esses defeitos sensoriais são resultantes da produção de compostos fenólicos como o guaiacol (2-metoxifenol), o 2,6-diclorofenol e o 2,6-dibromofenol (Huang *et al.*, 2015; Pornpukdeewattana *et al.*, 2020).

Estudos recentes continuam a evidenciar a relevância do género *Alicyclobacillus* como um dos principais responsáveis pela deterioração de bebidas ácidas, como sumos de fruta. Uma investigação realizada por Neggazi *et al.* (2023) reportou a presença de *A. acidoterrestris* em cerca de 18% das amostras de sumos pasteurizados e tratados por alta pressão hidrostática analisadas, evidenciando que, mesmo após tratamentos intensivos de conservação, os esporos de *Alicyclobacillus* podem sobreviver e germinar em condições favoráveis, conduzindo à deterioração do produto antes mesmo do seu consumo. Esse tipo de eventos, leva a desperdício alimentar, retirada de produtos do mercado, danos à reputação da marca devido à perda de confiança por parte dos consumidores, o que resulta em perdas económicas muito elevadas (Gordon *et al.*, 2017; Smit *et al.*, 2011). A nível ambiental, há ainda o desperdício de recursos utilizados na produção, como terra, água, energia e emissões de gases de efeito de estufa (FAO, 2022).

### 1.2.2 O género *Alicyclobacillus*

O género *Alicyclobacillus*, atualmente integrado na família *Alicyclobacillaceae* (Ciuffreda *et al.*, 2015), tem origem na descoberta, na década de 1960, de bactérias em fontes termais ácidas no Parque de Yellowstone, nos Estados Unidos (Spencer, 2009). Inicialmente, as espécies que atualmente pertencem ao género *Alicyclobacillus* estavam classificadas como integrando o género *Bacillus* (antes da revisão taxonómica e agora reclassificadas como *A. acidocaldarius*, *A. acidoterrestris* e *A. cycloheptanicus*), pois compartilham com os bacilos a característica da formação de esporos. Porém, em 1992, Wisotzkey *et al.* (1992) com base em análises filogenéticas do gene do RNA ribossomal 16S, reclassificaram as espécies mencionadas como parte de um novo género, tendo-se provado que existiam diferenças significativas em relação às demais espécies de *Bacillus*, como o baixo conteúdo de G+C e a presença de ácidos gordos  $\omega$ -alicíclicos ( $\omega$ -hexano e  $\omega$ -heptano) na bicamada lipídica (Chang & Kang, 2004).

Ao longo dos anos, mais espécies de *Alicyclobacillus* foram descritas, tais como *Alicyclobacillus hesperidum*, isolada de solos solfataras dos Açores por Albuquerque *et al.*, (2000), *A. herbarius* de chá de ervas por Goto *et al.* (2002) e Matsubara *et al.* (2002) que isolaram *A. acidiphilus* de bebidas ácidas. Atualmente, 29 espécies de *Alicyclobacillus* são conhecidas, e duas subespécies de *A. acidocaldarius* e de *A. hesperidum* foram igualmente registadas. Estas bactérias podem ser encontradas em diversos

ambientes, como solos, fontes termais, bem como em bebidas, concentrados e sumos de frutas (Bucka-Kolendo *et al.*, 2024; Sourri *et al.*, 2020).

Diversos meios têm sido utilizados para a detecção, isolamento e cultivo destas bactérias em contexto laboratorial. O primeiro meio desenvolvido para esse fim foi o "Yeast Starch Glucose" (YSG), seguido do meio "*Bacillus acidocaldarius* medium" (BAM), criado por Darland e Brock em 1971. Outros meios frequentemente usados incluem o "Orange Serum Agar" (OSA), o "K agar", o "SK agar", o "Potato Dextrose Agar" (PDA) e o "*Bacillus acidoterrestris* thermophilic" (BAT) (Groenewalds *et al.*, 2008; Anjos *et al.*, 2014). Estes meios diferem na composição de nutrientes, pH e presença de inibidores seletivos, que favorecem o crescimento seletivo de *Alicyclobacillus* em amostras contaminadas. O meio BAT, em particular, é formulado com extrato de levedura, glucose e outros componentes que promovem o crescimento termófilo e acidófilo característico destas bactérias, enquanto inibe o crescimento de outros microrganismos competidores. Estudos comparativos realizados por Murray *et al.* (2007) demonstraram que o BAT apresentava maior taxa de recuperação de colónias viáveis, maior especificidade e menor interferência de flora saprófita, quando comparado aos restantes meios testados. Por essa razão, o BAT é atualmente recomendado pela Federação Internacional de Produtores de Sumo de Fruta (International Fruit and Vegetable Juice Association, IFU) para a detecção de *Alicyclobacillus* em produtos de fruta (Sourri *et al.*, 2022). Quando cultivadas neste meio, as colónias formadas são opacas, circulares, com margens lisas e centros elevados, inicialmente de cor branca cremosa, escurecendo com o tempo (Henczka *et al.*, 2013).

### 1.2.3 Características fenotípicas do género *Alicyclobacillus*

*Alicyclobacillus* spp. são bactérias não patogénicas, gram-positivas, estritamente aeróbias, em formato de bastonete, formadoras de esporos e termoacidófilas (Ciuffreda *et al.*, 2015). Estas bactérias apresentam uma ampla gama de temperatura de crescimento, entre 20 °C e 70 °C, um pH de crescimento entre 2,0 e 6,0, com algumas exceções, como *Alicyclobacillus disulfidooxidans* e *Alicyclobacillus tolerans*, que conseguem crescer a temperaturas abaixo de 20 °C e a um pH inferior a 1,5 (Sourri *et al.*, 2022; Smit *et al.*, 2011). No entanto, independentemente de poderem crescer noutras condições, as temperaturas ótimas de crescimento variam entre 35 °C e 65 °C e os valores ótimos de pH variam entre 3,5 e 5,0 (M. Henczka *et al.*, 2013; Smit *et al.*, 2011).

Esta capacidade de crescimento em ambientes menos favoráveis, com temperaturas mais elevadas e valores de pH baixos, segundo a literatura (Poralla *et al.*, 1980; Chang & Kang, 2004; Ciuffreda *et al.*, 2015) pode estar relacionada com a presença de ácidos gordos  $\omega$ -alíclicos ( $\omega$ -hexano e  $\omega$ -heptano) na bicamada lipídica da membrana celular de *Alicyclobacillus* (Chang & Kang, 2004). A presença de anéis de ciclohexano aumenta a compactação da membrana, havendo conseqüentemente uma maior estabilidade da estrutura da mesma (o que resulta numa baixa difusão a altas temperaturas), proporcionando a estas bactérias uma vantagem para o crescimento em condições adversas (Ciuffreda *et al.*, 2015). Esses ácidos gordos criam uma camada protetora ao formarem ligações hidrofóbicas e ao reduzirem a permeabilidade da membrana celular (Chang & Kang, 2004; Bucka-Kolendo *et al.*, 2024). Contudo, nem todas as espécies deste género possuem esses ácidos e ainda assim permanecem resistentes a extremas condições, como é o caso das espécies *Alicyclobacillus aeris*, *Alicyclobacillus contaminans*, *Alicyclobacillus ferrooxydans*, *Alicyclobacillus macrosporangiidus* e *A. pomorum* (Sokołowska *et al.*, 2020). Outra possível justificação para a adaptação de bactérias deste género a esse tipo de condições poderá ser a presença de hopanoides (Poralla *et al.*, 1984) nas suas células. Esses compostos lipídicos, semelhantes ao colesterol, em condições de baixo pH e altas temperaturas,

umentam a estabilidade e a densidade da membrana, tornando-a mais resistente (Chang & Kang, 2004; Sourri *et al.*, 2022).

Outro fator de sobrevivência destas bactérias é a sua capacidade de esporulação. As estirpes de *Alicyclobacillus* são morfológicamente ovóides e formam esporos terminais ou subterminais, com algumas espécies apresentando esporângios inchados (Pornpukdeewattana *et al.*, 2020). A esporulação ocorre na fase estacionária do crescimento bacteriano, quando os nutrientes se tornam limitados, permitindo que a bactéria pare a sua divisão celular e inicie a produção de endósporos altamente resistentes a condições adversas, assegurando a sua sobrevivência (Rolfe *et al.*, 2012; Mckenney *et al.*, 2013).

Sabe-se que a resistência térmica dos esporos é influenciada por vários fatores ambientais, tais como os descritos abaixo (Sokołowska *et al.*, 2020; Smit *et al.*, 2011; Pornpukdeewattana *et al.*, 2020):

- Natureza intrínseca de diferentes espécies e estirpes;
- pH do meio de crescimento;
  - O valor D (tempo a uma determinada temperatura necessário para causar uma redução de 90% na população da bactéria-alvo) diminui à medida que o pH reduz.
- Temperatura;
  - O valor D diminui com o aumento da temperatura.
- Conteúdo de sólidos solúveis totais;
  - O valor D aumenta com o aumento de sólidos solúveis totais.
- Atividade de água;
  - A resistência térmica dos esporos aumenta à medida que os valores de atividade de água diminuem
- Presença de compostos, como catiões divalentes e antimicrobianos (Sourri *et al.*, 2022; Smit *et al.*, 2011).

A resistência dos esporos ao calor faz com que os mesmos sobrevivam aos processos habituais de pasteurização e representem para a indústria alimentar, um grave problema por resolver.

As espécies de *Alicyclobacillus* possuem ainda a capacidade de produzir guaiacol (2-metoxifenol) e alguns halofenóis que causam sobretudo deterioração de produtos à base de frutas, dando-lhes um sabor fenólico e antisséptico. O guaiacol é um composto aromático que, em alimentos contaminados por *Alicyclobacillus*, resulta da descarboxilação não oxidativa do ácido vanílico catalisada por enzimas microbianas (Cai *et al.*, 2015). Neste processo ocorre a descarboxilação não oxidativa do ácido vanílico em guaiacol, que pode ser formado consoante certos fatores: a estirpe e a espécie de *Alicyclobacillus*, a concentração de precursores do guaiacol como a vanilina e a tirosina, a presença de células vegetativas ou esporos, a temperatura, o oxigénio e a disponibilidade de nutrientes (Ciuffreda *et al.*, 2015; Corli Witthuhn *et al.*, 2013). Desta forma, de acordo com Savas Bahçeci *et al.*, (2005) é necessária uma concentração de  $10^4$  UFC/mL de células vegetativas de *Alicyclobacillus* para produzir quantidades de guaiacol detetáveis sensorialmente. Já os halofenóis 2,6-diclorofenol e 2,6-dibromofenol podem estar presentes em produtos alimentares devido à contaminação química ou à síntese microbiana. Os mesmos geralmente são formados pelo contacto do alimento com soluções halogenadas diluídas, frequentemente utilizadas na indústria, para desinfeção e limpeza de matérias-primas e linhas de processamento (Chang & Kang, 2004; Huang *et al.*, 2015).

Dado que múltiplos fatores influenciam a resistência térmica de *Alicyclobacillus*, a implementação de métodos de conservação eficazes deve considerar estas variáveis, para garantir a inativação ou o controlo

destes microrganismos com capacidade de produzir compostos fenólicos indesejáveis em produtos alimentares. No próximo capítulo, serão abordadas as principais estratégias utilizadas para prevenir e mitigar a contaminação por *Alicyclobacillus*, incluindo abordagens de natureza física, química e biológica.

### 1.3 Métodos de conservação contra *Alicyclobacillus*

Durante as últimas quatro décadas, desde o primeiro aparecimento relatado deste género em produtos alimentares, muitos métodos que pareciam ser facilmente implementáveis ou promissores foram desenvolvidos e aplicados para o seu controlo (Tianli *et al.*, 2014; Sokołowska *et al.*, 2020). No entanto, é essencial escolher métodos que prolonguem a vida útil do produto, assegurando a menor perda possível de vitaminas e nutrientes dos produtos, assim como a menor alteração possível na qualidade sensorial.

#### 1.3.1 Conservação física

Um dos métodos mais utilizados pela indústria de sumos de frutas é a pasteurização térmica. Esta utiliza altas temperaturas em um curto período (entre 70 °C e 85 °C por 1 a 5 min), de forma a preservar as propriedades organoléticas dos alimentos (Jair Wurlitzer *et al.*, 2019; Mandha *et al.*, 2023). No entanto, este tratamento convencional estimula a germinação dos esporos de *Alicyclobacillus*, já que os mesmos são capazes de resistir a esse tipo de temperaturas (Ciuffreda *et al.*, 2015; Sourri *et al.*, 2022). Uma solução seria o aumento das temperaturas de pasteurização (>100 °C), mas isso resultaria em mudanças organoléticas nos produtos. Outra opção seria o armazenamento dos mesmos, abaixo de 20 °C, já que são raras as espécies deste género que crescem nessas condições. No entanto, era necessário refrigerar o produto não só no ponto de venda, como também durante o transporte, o que representaria um aumento considerável nos custos (Chang & Kang, 2004).

Certos métodos não térmicos conseguem ser eficazes na eliminação de células vegetativas, mas têm eficácia limitada na destruição de esporos, visto que alguns esporos dormentes têm a capacidade de permanecer viáveis. Tratamentos como o processamento por alta pressão (High Pressure Processing, HPP) (Silva *et al.*, 2015), alta pressão hidrostática (High Hydrostatic Pressure, HHP), campos elétricos pulsados (Pulsed Electric Field, PEF), luz UV-C (Baysal *et al.*, 2013; Tremarin *et al.*, 2015), aquecimento óhmico (Kim *et al.*, 2017) ou micro-ondas e ondas ultrassónicas (Wang *et al.*, 2010) já demonstraram eficácia contra *Alicyclobacillus* (Sourri *et al.*, 2022; Merle & Montville, 2014). Ainda assim, todos estes métodos não são amplamente implementados na indústria alimentar, devido a custos elevados e limitações práticas, pelo que novas abordagens continuam a ser necessárias para garantir o controlo eficaz destes microrganismos em produtos alimentares (Merle & Montville, 2014).

#### 1.3.2 Conservação química

Relativamente a métodos químicos, estudos demonstraram que certos ácidos orgânicos, como o benzoico, butírico-caprílico, acético, cítrico-málico-lático e tartárico, demonstram eficácia contra células vegetativas de *Alicyclobacillus*, mas não contra esporos (Tianli *et al.*, 2014). Além disso, conservantes químicos como o benzoato de sódio e sorbato de potássio, permitidos em sumos de frutas pasteurizados até 150 mg/L e 300 mg/L, segundo o Regulamento (UE) 2024/2597 da Comissão Europeia, podem controlar o crescimento de *A. acidoterrestres*, embora sejam necessárias concentrações maiores para esporos, do que para inibir células vegetativas (Maldonado *et al.*, 2014). No entanto, esses

métodos apresentam desafios, tais como os riscos de alteração das características organolépticas dos produtos; os limites permitidos pelas entidades reguladoras da União Europeia, que cada vez têm sido mais reduzidos, de forma a proteger o consumidor; assim como os próprios consumidores que têm preferido "rótulos limpos" evitando compostos químicos percebidos como desconhecidos (Pornpukdeewattana *et al.*, 2020).

### 1.3.3 Conservação biológica

Em alternativa aos métodos químicos, existem métodos biológicos, que recorrem a metabolitos antimicrobianos produzidos por microrganismos, como as bacteriocinas, sendo a nisina um exemplo testado no controlo de *Alicyclobacillus*. Esta é aprovada pela FDA e pela WHO e é usada como conservante eficaz contra esporos em sumos de frutas, tanto diretamente quanto em filmes biodegradáveis (FSA *et al.*, 2017; Merle & Montville, 2014). Contudo, a sua eficácia depende do substrato alimentar, da espécie em questão e é limitada pelos altos custos de extração e purificação (Pei *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2015). Adicionalmente, nos últimos anos, várias pesquisas consideraram a aplicação de óleos essenciais ou os seus constituintes ativos, como agentes naturais de conservação contra *Alicyclobacillus* (Bevilacqua *et al.*, 2011; Huertas *et al.*, 2014). Além dos óleos essenciais, extratos vegetais (e.g., limão, alecrim e semente de uva) também foram testados quanto ao seu potencial antimicrobiano (Ciuffreda *et al.*, 2015; Piskernik *et al.*, 2016).

No entanto, os diferentes métodos descritos podem apresentar desvantagens, tais como custos associados, danos potenciais aos equipamentos de processamento, devido à sua natureza corrosiva, assim como um impacto negativo nas qualidades organolépticas (e possivelmente no valor nutricional) dos alimentos.

Mais recentemente, métodos de bioconservação com base em bacteriófagos têm sido cada vez mais explorados e estudados, demonstrando bastante potencial no controlo de bactérias indesejadas. Cocktails destes vírus podem ser utilizados para desinfetar superfícies de produção, durante a lavagem da matéria-prima ou até mesmo adicionados diretamente ao produto final (Sokołowska *et al.*, 2020).

## 1.4 Bacteriófagos como meio de biocontrolo

### 1.4.1 Definição e características

Os bacteriófagos, ou fagos, são vírus que infetam exclusivamente bactérias e são a entidade biológica mais abundante na Terra (Batinovic *et al.*, 2019). Têm papéis-chave em todos os ecossistemas devido à sua ação sobre as bactérias e transportam uma grande diversidade genética nos seus genomas. Foram descobertos no início do século XX por Frederick Twort e Felix d'Herelle que logo propuseram a sua aplicação para o tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias. Essa estratégia, denominada de terapia fágica, foi, no entanto, substituída pelo uso de antibióticos, até que, mais recentemente, devido ao aumento da resistência observada em bactérias, ressurgiu o interesse no uso dos mesmos como antimicrobianos. Para além disso, a aplicação de fagos não está somente restrita à clínica, sendo também agora uma opção viável para o combate de bactérias indesejadas em diversos ramos, incluindo a indústria alimentar (Rendueles *et al.*, 2022; Maffei *et al.*, 2021).

Os bacteriófagos podem ser encontrados em diversos ambientes onde as bactérias prosperam, como águas residuais, fontes termais, estações de tratamento de água e solos. A partícula viral dos fagos apresenta uma estrutura composta por um capsídeo proteico que encapsula o material genético, o qual pode ser RNA ou DNA (de cadeia simples ou dupla). Alguns bacteriófagos podem ainda possuir um envelope lipídico externo, embora esta característica seja menos comum. Adicionalmente, podem possuir uma cauda com fibras, que desempenha um papel na adsorção do fago à superfície da célula hospedeira, ajudando-o a ligar-se a recetores específicos (Mourosi *et al.*, 2022). A sua especificidade estrutural reflete-se na sua ação altamente seletiva, uma vez que cada tipo de bacteriófago geralmente infeta apenas determinadas estirpes ou espécies bacterianas.

#### 1.4.2 Ciclo lisogénico e lítico

Os bacteriófagos podem ser classificados em dois tipos principais de acordo com o modo de infeção da bactéria hospedeira: estritamente líticos ou virulentos, quando seguem exclusivamente o ciclo lítico, e temperados quando, em alternativa ao ciclo lítico, são capazes de seguir o ciclo lisogénico (Gao & Feng, 2023). No ciclo lisogénico, o fago integra o seu genoma na bactéria hospedeira enquanto profago, replicando-se de forma passiva à medida que a célula hospedeira se divide. Este permanece assim, em um estado dormente até que condições favoráveis estimulem a sua ativação para o ciclo lítico (Wang *et al.*, 2022).

Contrariamente, no ciclo lítico, após a inserção do seu material genético na célula hospedeira, o mesmo é de imediato replicado no citoplasma e os seus genes expressos. Como resultado, há a produção de novas partículas virais com recurso à maquinaria de síntese da bactéria, as quais são finalmente libertadas para o meio extracelular pela indução da destruição (lise) da célula hospedeira, podendo os novos fagos iniciar novas infeções (Vikram *et al.*, 2021).

Na indústria alimentar, apenas fagos estritamente líticos são aplicáveis, pois estes suportam a destruição das células bacterianas infetadas sem integração do material genético fágico no genoma do hospedeiro (Vikram *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2022).

#### 1.4.3 Bacteriófagos como bioconservantes na indústria alimentar

A bioconservação usando bacteriófagos líticos é uma tecnologia direcionada, eficaz, natural e ecológica, estando em conformidade com alegações orgânicas e veganas. Não afeta o sabor, a cor ou o aroma, e não exige rotulagem (“clean label”), pois são considerados auxiliares de processamento. Este método biológico de conservação de alimentos foi aprovado para uso em vários países fora da União Europeia, como os EUA, o Canadá e a Suíça (Wang *et al.*, 2022; Osei *et al.*, 2022; Moye *et al.*, 2018).

Existem bacteriófagos disponíveis comercialmente para uso em diversos contextos (na matéria-prima, no produto final, em superfícies de contacto com alimentos ou no ambiente de processamento) (Shymialevich *et al.*, 2023). Existem fagos comerciais que têm como alvos, patógenos alimentares indesejados tais como PhageGuard Listex™ e ListShield™ contra *Listeria monocytogenes*, PhageGuard S™ e SalmoFresh™ contra *Salmonella*, ou EcoShield™ e Finalyse® contra *E. coli* O157, todos com o estatuto de geralmente reconhecidos como seguros (GRAS, EUA), tendo sido aprovados para aplicações em alimentos, rações, gado ou superfícies de contacto (por exemplo, FDA) (U.S. Food & Drug 2016).

Na Europa, encontram-se aprovados os produtos à base de fagos Biolyse® e BAFASAL® destinados a aplicações agrícolas. O primeiro, é utilizado no controlo de fitopatógenos responsáveis pela deterioração de saladas, pela podridão mole da batata e por manchas em cogumelos, enquanto o segundo é aplicado na eliminação de *Salmonella* spp. patogénicas para o ser humano na produção avícola (Połaska & Sokołowska, 2019).

Até ao momento, apenas se encontram descritos na literatura dois fagos com a capacidade de infetar o género *Alicyclobacillus*, PhiNS11 (Sakaki *et al.*, 1976) e KKP 3916 (Shymialevich *et al.*, 2023), mas sem avanços adicionais.

## 1.5 Objetivos

Neste trabalho, foram delineadas estratégias para a descoberta de fagos com atividade lítica contra bactérias deteriorantes do género *Alicyclobacillus*, juntamente com metodologias para caracterizar fenotípica e molecularmente os mesmos, tendo em vista aplicações de biocontrolo e bioconservação na indústria alimentar e de bebidas.

Os objetivos específicos foram:

- Isolamento de fagos
- Purificação de fagos, amplificação clonal e criopreservação
- Caracterização fenotípica e molecular de fagos

## 2 Materiais e Métodos

### 2.1 Estirpes bacterianas, meios de cultura e amostras ambientais

#### 2.1.1 Estirpes bacterianas

Foram utilizadas estirpes-tipo de três diferentes espécies de *Alicyclobacillus* adquiridas à Coleção Alemã de Microrganismos e Culturas Celulares (DSMZ): *A. acidoterrestris* DSM 3922<sup>T</sup> (= ATCC 49025<sup>T</sup> = LMG 16906<sup>T</sup>), *A. acidocaldarius* DSM 446<sup>T</sup> (=ATCC 27009<sup>T</sup> = IFO 15652<sup>T</sup>) e *A. cycloheptanicus* DSM 4006<sup>T</sup> (= ATCC 49028<sup>T</sup> = IFO 15310<sup>T</sup>). Além disso, usaram-se estirpes de *A. acidoterrestris* existentes na coleção de culturas interna do laboratório Microbiology and Molecular Biology da Divisão Sustainability for Food & Health do iBET. Estas estirpes identificadas com os nomes TAB 4, TAB 7, TAB 8, TAB 12, TAB 13, TAB 21, TAB 47 e TAB 48 foram obtidas a partir de açúcar e sumos de fruta produzidos em Portugal e encontram-se descritas na Tabela 2.1.

**Tabela 2.1** - Espécie, origem, produção de guaiacol e número das estirpes utilizadas no presente trabalho. +: produção de guaiacol; -: não produção de guaiacol.

Estirpe	Espécie	Origem	Produção de Guaiacol	Referência
DSM 4006 <sup>T</sup>	<i>A. cycloheptanicus</i>	Solo (DSMZ)	+	G. Deinhard <i>et al.</i> , 1987
DSM 446 <sup>T</sup>	<i>A. acidocaldarius</i>	Fonte termal ácida (DSMZ)	-	G. Darland <i>et al.</i> , 1971
DSM 3922 <sup>T</sup>	<i>A. acidoterrestris</i>	Solo de jardim (DSMZ)	+	J. Wisotzkey <i>et al.</i> , 1992
TAB 4	<i>A. acidoterrestris</i>	Concentrado de sumo de maracujá	+	A. Fernandes, 2022
TAB 7	<i>A. acidoterrestris</i>	Néctar de pêssego	+	A. Fernandes, 2022
TAB 8	<i>A. acidoterrestris</i>	Néctar de pêssego	+	A. Fernandes, 2022
TAB 12	<i>A. acidoterrestris</i>	Néctar de pêssego	+	A. Fernandes, 2022
TAB 13	<i>A. acidoterrestris</i>	Néctar de pêssego	+	A. Fernandes, 2022
TAB 21	<i>A. acidoterrestris</i>	Concentrado de sumo de tangerina	+	A. Fernandes, 2022
TAB 47	<i>A. acidoterrestris</i>	Açúcar	+	A. Fernandes, 2022
TAB 48	<i>A. acidoterrestris</i>	Concentrado de sumo de tangerina	+	A. Fernandes, 2022

### 2.1.2 Meios de cultura

Para o cultivo das diferentes espécies utilizadas neste trabalho, foram utilizados meios de cultura específicos de modo a garantir o seu crescimento ótimo. Para as estirpes de *A. acidocaldarius* e *A. acidoterrestris* utilizou-se o meio BAT (Scharlau). Para o cultivo em meio líquido, utilizou-se o meio BAT preparado conforme as indicações do fabricante e ajustado para pH 4 com solução de 5 M de HCl, antes da sua esterilização a 121 °C durante 15 min. Para a preparação do meio BAT sólido com uma concentração final de 15 g/L de agar, preparou-se 1 volume de meio BAT líquido (2x concentrado relativamente à concentração final necessária), com o pH ajustado a 4 com uma solução de 5 M de HCl, e 1 volume de agar a 30 g/L (2x concentrado relativamente à concentração final necessária). Ambas as soluções foram autoclavadas individualmente a 121 °C durante 15 min. O processo de esterilização em separado deve-se ao facto do agar hidrolisar a pH ácido e assim perder a sua capacidade de gelificação do meio. Depois de autoclavadas, as duas soluções estéreis foram então misturadas enquanto estavam quentes (>60 °C), sendo a mistura usada de imediato para encher placas de Petri.

Para o cultivo da estirpe de *A. cycloheptanicus* em meio sólido, utilizou-se o meio YSG (Condalab). A preparação foi feita à semelhança do anteriormente descrito para o meio BAT sólido.

Para a otimização dos meios de difusão e a avaliação da estabilidade da suspensão fágica, utilizou-se o tampão SM a pH 7 e BAT líquido a pH 7 (pH ajustado com solução de 5 M de NaOH) e o tampão SM a pH 4 e BAT líquido a pH 4 (pH ajustado com solução de 5 M de HCl). A esterilização dos meios de difusão foi realizada conforme descrito anteriormente.

### 2.1.3 Amostras ambientais

Foram colhidas amostras ambientais de diferentes origens, de forma a serem posteriormente processadas e testadas, representadas na Tabela 2.2. As amostras provenientes de compostagem (Códigos 1, 2 e 19) foram recolhidas numa empresa responsável pela produção de produtos hortícolas biológicos. As amostras de solo (Códigos 3, 4, 5, 6, 15, 16, 17, 18, 20 e 21) tiveram como origem o solo de uma vinha localizada na estação agronómica onde está inserido o iBET, o solo de um pomar de uma residência e o solo de uma horta. As restantes amostras (Códigos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14) são provenientes de diferentes etapas do processo de uma empresa de processamento de frutas.

**Tabela 2.2** - Origem, código e data de recolha das amostras ambientais utilizadas no presente trabalho.

<b>Amostras</b>	<b>Código</b>	<b>Data de colheita</b>
Compostagem	1	12/07/2023
Compostagem	2	12/07/2023
Solo do campo	3	12/07/2023
Solo da vinha	4	10/07/2023
Solo da vinha	5	03/11/2023
Solo da vinha	6	08/01/2024
Reservatório de processamento de tomate	7	26/07/2023
Polpa de pêsego triturado	8	26/07/2023
Efluente de lavagem de frutas	9	26/07/2023
Efluente da 1ª lavagem de frutas	10	26/07/2023
Efluente do transporte de tomate	11	26/07/2023
Efluente com terra e resíduos	12	18/08/2023
Efluente do Tanque de Receção de Tomate	13	18/08/2023
Resíduo de polpa de tomate	14	18/08/2023
Solo Pomar (Nespereira)	15	15/01/2024
Solo Pomar (Morangueiro)	16	15/01/2024
Solo Pomar (Marmeleiro)	17	15/01/2024
Solo Pomar (Limoeiro)	18	15/01/2024
Composto	19	11/03/2024
Solo de horta	20	11/03/2024
Solo com resíduo orgânico animal	21	11/03/2024

Nota: A letra “T” em sobrescrito indica que se trata da estirpe-tipo da espécie em questão.

## **2.2 Métodos de microbiologia convencional**

Todo o material utilizado para realizar o trabalho de microbiologia convencional descrito nestas seguintes secções encontrava-se estéril ou foi previamente esterilizado.

### **2.2.1 Condições gerais de crescimento**

Sempre que foi necessário iniciar experiências com colónias frescas de *A. acidoterrestris*, *A. cycloheptanicus* e *A. acidocaldarius*, estas foram obtidas em meio sólido pela sementeira com uma ansa descartável de 10 µL, incubando-se as culturas até as colónias atingirem as dimensões adequadas. As culturas de *A. acidoterrestris* e *A. acidocaldarius* foram incubadas a 43 °C, enquanto as de *A. cycloheptanicus* foram incubadas a 37 °C. Se necessário, estas placas foram armazenadas a 4 °C por um período máximo de três semanas.

Para a realização de ensaios, uma colónia de cada placa foi inoculada em 5 mL de meio BAT líquido. As culturas de *A. acidoterrestris* e *A. cycloheptanicus* foram incubadas a 37 °C durante a noite sob agitação orbital de 180 rpm (New Brunswick Innova 42R), e *A. acidocaldarius* a 55 °C sem agitação orbital. No dia seguinte, o crescimento foi retomado com a inoculação de 100 µL da cultura da noite

anterior em 5 mL de meio BAT líquido, ficando a incubar até atingir a densidade ótica (DO) a 600 nm de aproximadamente 0,4 para *A. acidoterrestris*, aproximadamente 1 para *A. acidocaldarius* e aproximadamente 0,5 para *A. cycloheptanicus*. Estas densidades óticas foram escolhidas através da determinação prévia das curvas de crescimento ao longo do tempo.

### 2.2.2 Processamento de amostras ambientais

As amostras ambientais usadas em testes de isolamento de bacteriófagos foram separadas em duas categorias, sólidas e líquidas, e processadas diferencialmente dependendo da sua categoria.

Para as amostras sólidas, tal como os solos, adicionou-se um volume equivalente a aproximadamente 20 mL de amostra a um tubo de centrífuga. Adicionaram-se 20 mL de meio BAT líquido, seguindo-se uma homogeneização com o agitador vórtex, durante 5 s. Deixou-se sedimentar a mistura durante 1 h à temperatura ambiente, de modo a permitir a recolha do sobrenadante. O sobrenadante foi filtrado através de um filtro de seringa de 0,45 µm.

As amostras líquidas foram centrifugadas durante 10 min a 7000 g, e posteriormente filtradas por filtro de seringa de 0,45 µm.

Todas as amostras filtradas foram guardadas a 4 °C e testadas num prazo não superior a 2 dias. Ao longo do trabalho foram sempre usados filtros de seringa com poro 0,45 µm (PES - polietersulfona).

### 2.2.3 Incubação de amostras ambientais

Amostras processadas como descrito no ponto anterior (secção 2.2.2), ou sem processamento prévio, foram incubadas de modo a amplificar eventuais fagos presentes nas amostras, proporcionando condições favoráveis à sua replicação. A incubação das mesmas foi feita de duas formas, conforme descrito de seguida.

- Incubação de amostras ambientais sem processamento prévio

Nesta incubação, a amostra ambiental sólida, sem tratamento prévio, foi diretamente posta em contacto com o meio BAT líquido, como descrito a seguir. A um tubo de centrífuga de 50 mL, foi adicionado um volume equivalente a 20 mL de amostra sólida e 20 mL de meio BAT líquido. O meio de cultura foi posto a incubar à temperatura ambiente com baixa agitação durante 24 h. No dia seguinte, a cultura foi centrifugada a 8000 g durante 10 min e o sobrenadante contendo eventuais fagos amplificados devido à presença de bactérias hospedeiras foi filtrado por filtro de seringa.

- Enriquecimento de bacteriófagos de amostras ambientais processadas

O protocolo de enriquecimento com amostra processada foi realizado como descrito por Shymialevich *et al.* (2023) com algumas modificações. De modo a enriquecer eventuais fagos presentes nas amostras ambientais processadas como anteriormente descrito, estas foram incubadas conforme descrito a seguir. A um tubo de centrífuga, adicionaram-se 20 mL de meio BAT líquido duas vezes concentrado, 20 mL de amostra filtrada (processamento descrito na secção 2.2.2) e 1 mL de uma cultura de *Alicyclobacillus* incubada durante a noite (descrito na secção 2.2.1). A mistura foi incubada a 43 °C até atingir o início da fase estacionária (cerca de 6 h), exceto para a espécie *A. acidocaldarius* em que a incubação foi realizada a 55 °C. De seguida, a cultura foi centrifugada a 6000 g por 10 min, de forma a ocorrer a

sedimentação das bactérias. O sobrenadante potencialmente contendo bacteriófagos amplificados foi filtrado por filtro de seringa.

#### **2.2.4 Detecção de bacteriófagos por técnica de dupla camada em placa de agar**

- Detecção de bacteriófagos por incorporação

Para o isolamento de bacteriófagos, foi utilizado o método de dupla camada em placa de agar, ou em inglês “double-layer agar method”, termo utilizado no presente trabalho. Para isto, 100 µL de uma cultura de *Alicyclobacillus* em fase exponencial de crescimento em meio BAT (descrito na secção 2.2.1) foram adicionados a 500 µL de amostra filtrada ou sem enriquecimento ou incubada conforme descrito na secção 2.2.3. Esta mistura foi deixada a incubar à temperatura ambiente por 10 min, para permitir que os fagos eventualmente presentes pudessem adsorver à superfície das bactérias. Após esta incubação, a mistura foi adicionada a 4,5 mL de top agar, composto por meio BAT líquido a pH 4 suplementado com 5 g/L de agar, aquecido e mantido líquido a 50 °C num banho seco, até ser usado. A mistura completa – cultura, amostra e top agar – foi agitada num vórtex e espalhada uniformemente sobre a superfície de uma placa de Petri com meio BAT sólido. As placas foram deixadas a secar entre 10 e 15 min e posteriormente incubadas a 43 °C durante a noite. No dia seguinte, foram observados os resultados.

- Detecção de bacteriófagos por “spot plating”

O método de “spot plating” foi utilizado para detetar a presença de fagos em amostras enriquecidas ou sem enriquecimento. Para tal procedeu-se à incorporação de 100 µL de cultura de *Alicyclobacillus* em fase ativa de crescimento em 4,5 mL de top agar a 50 °C, conforme anteriormente descrito, mas sem a adição de amostra. A mistura completa foi agitada num vórtex e espalhada uniformemente sobre a superfície de uma placa de Petri com meio BAT sólido. Deixou-se a secar entre 10 e 15 min para posteriormente serem depositados 10 µL (“spot”) de cada amostra filtrada a testar. As placas foram deixadas a secar cerca de 15 min e posteriormente incubadas a 43 °C durante a noite. No dia seguinte, foram observados os resultados.

#### **2.2.5 Purificação de bacteriófagos**

O processo de purificação de fagos consistiu na seleção de uma placa fágica isolada, na sua recuperação, difusão e subsequentemente plaqueamento utilizando o método de dupla camada em placa de agar (ponto 2.2.4). Para tal, uma placa fágica individual foi cuidadosamente recolhida com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, através de uma leve pressão na superfície do agar, removendo-se o fragmento de agar correspondente à zona de lise. O fragmento foi transferido para um microtubo de centrifuga, contendo 1 mL de meio BAT líquido. A difusão das partículas fágicas do agar para o meio foi realizada por incubação a 45 °C, e foi testada a incubação durante 2 h e 24 h, num banho seco com 300 rpm de agitação (Thermomixer, Eppendorf). Após este período, o sobrenadante, a partir de agora designado por eluído, foi filtrado por filtro de seringa para outro microtubo.

De seguida, procedeu-se ao plaqueamento do eluído, através da metodologia descrita no ponto 2.2.4, por “spot plating” com um “spot” com o eluído filtrado e outro “spot” sem filtração do eluído. Realizou-se ainda o método por incorporação do tipo “double-layer agar method”, utilizando-se 100 µL de cultura de *Alicyclobacillus* ativamente a crescer, 100 µL de uma diluição seriada do eluído e 4,5 mL de top agar a 50 °C. O processo de purificação, quando aplicável, requer a repetição de vários ciclos sucessivos até

à obtenção de uma morfologia consistente de placas fágicas, assegurando que estas resultam de uma única infecção.

Para a otimização dos meios de difusão, foram testadas diferentes soluções tamponadas. Diferentes placas fágicas individuais foram postas a difundir em 1 mL de tampão SM a pH 7 e em meio BAT líquido a pH 4 respectivamente, como descrito acima. A difusão foi feita com agitação a 300 rpm e sem agitação, assim como à temperatura ambiente e a 45 °C.

## 2.2.6 Amplificação de bacteriófagos

Um dos processos para poder obter uma suspensão amplificada de bacteriófagos passa pela obtenção em primeiro lugar de placas “webbed”, caracterizadas por serem placas de Petri com placas fágicas densamente distribuídas e confluentes, restando apenas uma “rede” de bactérias entre si. Para a obtenção de placas “webbed”, foi realizada a metodologia descrita no ponto 2.2.4, utilizando uma diluição que garanta a sobreposição da maioria das placas fágicas. Depois de escolhida a diluição indicada para a obtenção de placas “webbed”, foi feito um conjunto de placas deste tipo. As placas foram inundadas com 5 mL de meio BAT líquido e ficaram a incubar a 45 °C, com 70 rpm de agitação, durante 24 h. Com o auxílio de uma micropipeta, recolheu-se o agora denominado lisado (resultado da lise celular), o qual foi filtrado por filtro de seringa. Sempre que necessário, as caixas de Petri com placas fágicas foram guardadas a 4 °C.

Para a avaliação da estabilidade da suspensão fágica obtida, o lisado proveniente da inundação das placas “webbed” foi submetido a diluições seriadas de 1:99 (v/v) com tampão SM ajustado a pH 4 e a pH 7, assim como em meio BAT líquido a pH 4 e pH 7. Foi realizada a metodologia de dupla camada em placa de agar, com incorporação do tipo “double-layer agar method” para o cálculo do título fágico no dia do ensaio e após 14 dias. As suspensões permaneceram guardadas a 4 °C durante esse período.

## 2.2.7 Determinação do título fágico

O título fágico, ou concentração de partículas fágicas, é expresso em unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/mL). A determinação do título de uma amostra ou suspensão foi realizada utilizando a metodologia de dupla camada em placa de agar, mediante a incorporação, conforme descrito no ponto 2.2.4. Para a preparação da dupla camada com a suspensão de fagos, utilizaram-se 100 µL de cultura de *Alicyclobacillus* ativamente a crescer, 100 µL de uma diluição seriada da suspensão de fagos e 4,5 mL de top agar a 50 °C. Após a incubação das placas, o título foi calculado com base na contagem de placas obtida na diluição que apresentou um número de unidades formadoras de placa adequado para a sua contagem (30–300 UFP por placa).

Para os cálculos dos títulos fágicos foi usada a seguinte fórmula adaptada de protocolos do SeaPhages (n.d.):

$$\text{Título (UFP/mL)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ placas contadas} \times \text{Fator de diluição}}{\text{Volume de inóculo (mL)}} \quad (2.1)$$

Nº de placas contadas: corresponde à quantidade de placas de lise visíveis na placa de agar que contém entre 30 e 300 UFP por placa; Fator de diluição: corresponde ao inverso da diluição aplicada (por exemplo, a uma diluição de  $10^{-6}$  corresponde um fator de diluição é  $10^6$ ); Volume de inóculo: corresponde ao volume em mililitros de amostra que foi plaqueada na placa de agar.

### **2.2.8 Obtenção de suspensão de fagos concentrada**

Para obter uma suspensão fágica com um título mais elevado adequado à extração de DNA de alta qualidade (aproximadamente  $10^9$  UFP/mL), foram preparados 20 mL de lisado, posteriormente submetidos à centrifugação durante a noite a 4 °C, a 15000 g, utilizando um rotor JA-25.50 (Beckman Avanti J-26). O sobrenadante foi cuidadosamente descartado, e o “pellet” resultante foi ressuspensão em 500 µL de BAT líquido. A suspensão obtida foi incubada durante 2 h à temperatura ambiente, sob agitação orbital a 50 rpm e inclinação de 45°. Em paralelo, o tubo original utilizado para a centrifugação noturna foi lavado com meio BAT líquido, para remover resíduos de fagos aderidos às paredes internas, e o volume foi recuperado (Descartado I). O “pellet” entretanto ressuspensão (denominado Descartado II) foi transferido para um novo tubo e centrifugado a 6000 g durante 5 min à temperatura ambiente. O sobrenadante desta centrifugação foi guardado (Amostra I).

As frações: Descartado I, Descartado II e Amostra I foram tituladas segundo o protocolo descrito na Secção 2.2.4, de forma a determinar o título inicial (UFP/mL) antes da extração de ácidos nucleicos.

## **2.3 Métodos moleculares**

### **2.3.1 Extração de ácidos nucleicos**

Para remover os ácidos nucleicos bacterianos exógenos aos fagos íntegros presentes nas amostras, as mesmas foram inicialmente submetidas a um tratamento enzimático com DNase e RNase. O protocolo utilizado foi adaptado do DNA-free™ Kit (Thermo Fisher Scientific), o qual contém DNase I, que degrada o DNA, e tampão de reação, que maximiza a eficiência na digestão do DNA. Posteriormente, a DNase I foi inativada através da adição de um reagente de inativação específico. O tratamento com RNase (New England Biolabs) foi feito por incubação a 37 °C, durante 30 min., utilizando uma concentração final de 0,5 µg/µL. A RNase não foi inativada diretamente, sendo removida nas etapas de purificação subsequentes.

A extração de ácidos nucleicos foi realizada utilizando o PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific), de acordo com as instruções do fabricante. Este protocolo é adequado para a extração de RNA e DNA viral a partir de pequenos volumes ( $\leq 500$  µL) de suspensões virais e, neste estudo, foi aplicado a 200 µL de amostra. Para promover a lise eficiente das partículas virais, as amostras foram tratadas com proteinase K e tampão de lise, submetendo-se a temperaturas elevadas para maximizar a libertação dos ácidos nucleicos. A purificação foi realizada utilizando colunas de centrifugação, onde os ácidos nucleicos são seletivamente adsorvidos à matriz de sílica, enquanto impurezas, como proteínas e nucleases, são removidas por sucessivas lavagens com tampões de lavagem. Os ácidos nucleicos foram eluídos em água de grau molecular, livre de DNases e RNases.

### **2.3.2 Análise de pureza, quantificação e visualização**

Os ácidos nucleicos extraídos como descrito na secção 2.3.1 foram submetidos à análise de pureza, quantificação e visualização.

A quantificação foi realizada com um espectrofotômetro UV-Vis de microvolume NanoDrop One<sup>C</sup> (Thermo Fisher Scientific). Foram avaliadas as razões de absorvância a 260 nm/280 nm e 260 nm/230 nm, que indicam a presença de contaminantes proteicos e orgânicos, respectivamente.

A quantificação foi complementada por fluorometria, utilizando um fluorômetro Qubit 4.0 (Invitrogen, Carlsbad), de acordo com os protocolos dos kits Qubit RNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific), Qubit ssDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) e Qubit dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Estes ensaios baseiam-se na ligação específica de fluoróforos aos respectivos ácidos nucleicos (RNA, DNA de cadeia simples e DNA de cadeia dupla, respectivamente), permitindo a quantificação sensível através da emissão de fluorescência proporcional à concentração dos alvos presentes nas amostras.

O DNA extraído foi também analisado em gel de agarose para avaliar a sua integridade. O gel foi preparado com 1% (p/v) agarose em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA), tendo este sido corado com 2 µL de “GreenSafe Premium” (NZYTech) por incorporação. Em cada poço do gel foi adicionada uma mistura de 10 µL de cada amostra, assim como 2 µL de tampão que suporta o correto carregamento das amostras no gel. A fotografia do gel foi tirada num transiluminador com aquisição de imagem (Gel Doc EZ System, Bio-Rad).

### 3 Resultados e Discussão

#### 3.1 Isolamento de bacteriófagos

Para o isolamento de bacteriófagos com potencial de aplicação no biocontrolo de estirpes do género *Alicyclobacillus*, foram inicialmente testadas 21 amostras ambientais (identificadas na Tabela 2.2), utilizando diferentes estirpes bacterianas como possíveis hospedeiras.

O processo de deteção de bacteriófagos (metodologia na secção 2.2.4) incluiu a análise de amostras ambientais seguindo três abordagens distintas. A primeira consistiu na utilização de amostras ambientais processadas e não enriquecidas (Tabela 3.1). A segunda abordagem correspondeu ao uso de amostras ambientais processadas e enriquecidas (metodologia na secção 2.2.3) de forma a promover a amplificação de eventuais fagos presentes, e os resultados encontram-se representados na Tabela 3.2. Por fim, avaliou-se a utilização de amostras ambientais incubadas sem processamento prévio (metodologia 2.2.3), como tentativa adicional de amplificação fágica (Tabela 3.3).

**Tabela 3.1** - Deteção de placas fágicas após ensaio de dupla camada em placa de agar com amostras ambientais processadas e não enriquecidas, utilizando diferentes estirpes hospedeiras.

Estirpe hospedeira	Código da amostra ambiental testada	Número de placas fágicas detetadas por amostra ambiental testada
DSM 3922 <sup>T</sup>	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21	1 – Teste com Amostra 4
DSM 4006 <sup>T</sup>	4,13	0
DSM 446 <sup>T</sup>	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13	0
TAB 12	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10, 11,12,13	0
TAB 21	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,19,20, 21	0
TAB 47	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13	0
TAB 48	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,18,19,20,21	0

Dos testes realizados, a estirpe DSM 3922<sup>T</sup> mostrou ser suscetível à composição da Amostra 4 (solo de vinha), devido a uma eventual presença de fagos, resultando na formação de uma placa fágica putativa. Nenhuma das restantes espécies e estirpes testadas apresentou indícios de infeção fágica. Esta ausência de infeção pode refletir, por um lado, uma reduzida abundância de fagos nas amostras ambientais analisadas. Por outro lado, os fagos eventualmente presentes poderão não apresentar especificidade para as estirpes testadas, embora possam ser capazes de infetar outras estirpes ou espécies de *Alicyclobacillus* não incluídas neste ensaio. Estudos recentes (Shymialevich *et al.*, 2023; Santamaría *et al.*, 2014) evidenciam que os bacteriófagos apresentam frequentemente um espectro de hospedeiros limitado, com infeciosidade variável entre estirpes. No caso de *Alicyclobacillus*, foi demonstrado que isolados de fagos exibem um perfil de infeção estreito, sendo capazes de infetar apenas um subconjunto de estirpes e, por vezes, algumas espécies próximas. De forma consistente, Santamaría *et al.* (2014) mostraram que fagos

isolados de *Rhizobium etli* também apresentavam espectros de hospedeiros restritos, sendo específicos para determinadas estirpes de *R. etli* e incapazes de infectar espécies relacionadas.

A combinação entre a Amostra 4 e a estirpe DSM 3922<sup>T</sup> apresentou um padrão de resposta singular relativamente às restantes combinações testadas, sugerindo a existência de fatores específicos que condicionaram a infecção fágica nesse caso particular. Embora não seja possível determinar com precisão a causa dessa diferença, algumas hipóteses podem ser levantadas, tais como características particulares da Amostra 4, que poderão influenciar a interação fago-hospedeiro, ou possíveis variações fisiológicas na estirpe DSM 3922<sup>T</sup> provocadas pela presença da Amostra 4, que resultaram num perfil único.

Devido à ausência de placas fágicas em todas as amostras analisadas, com exceção da Amostra 4 (Tabela 3.1), algumas amostras foram sujeitas a enriquecimento (ver Tabela 3.2) de forma a aumentar a probabilidade de detecção de fagos. O tempo e a temperatura de incubação utilizados corresponderam às condições apropriadas para o crescimento das estirpes hospedeiras em estudo.

**Tabela 3.2** - Detecção de placas fágicas após ensaio de dupla camada em placa de agar com amostras ambientais processadas e enriquecidas, utilizando diferentes estirpes hospedeiras. Amostras incubadas em meio BAT líquido, a 43 °C durante 6 h.

<b>Estirpe hospedeira</b>	<b>Código da amostra ambiental testada</b>	<b>Número de placas fágicas detetadas por amostra ambiental testada</b>
<b>DSM 3922<sup>T</sup></b>	4,15,17	4 – Teste com Amostra 4
<b>DSM 446<sup>T</sup></b>	4	0
<b>TAB 21</b>	4,8,9,10, 19,20,21	0
<b>TAB 48</b>	4,8,9,10, 19, 20,21	0

Para o enriquecimento com *A. acidoterrestris* DSM 3922<sup>T</sup> foram uma vez mais observadas placas fágicas (quatro) quando testada a Amostra 4. Nenhuma das restantes estirpes TAB (21 e 48), assim como DSM 446<sup>T</sup> mostrou sinais de infecção fágica sob as condições testadas.

Os resultados sugerem que, entre as condições testadas, apenas a combinação da DSM 3922<sup>T</sup> com a Amostra 4 (solo de vinha) apresentou indícios de suscetibilidade à infecção fágica, uma vez que foi nesta condição que se observaram putativas placas fágicas. Ao comparar os dados apresentados na Tabela 3.1 com os da Tabela 3.2, verifica-se, conforme esperado, que a probabilidade de formação de placas fágicas é superior quando as amostras ambientais são submetidas a um processo de enriquecimento, refletindo o aumento da concentração de partículas fágicas obtido com esta abordagem.

A tentativa adicional de amplificação fágica (Tabela 3.3) foi feita com três amostras ambientais recolhidas no mesmo dia. Foram escolhidas apenas duas estirpes hospedeiras para o ensaio de dupla camada em placa de agar, e os resultados mostram a ausência de formação de placas fágicas. Estes resultados demonstram, assim, que, nas condições testadas, as amostras não continham fagos capazes de infectar as estirpes.

**Tabela 3.3** - Detecção de placas fágicas após ensaio de dupla camada em placa de agar com amostras ambientais incubadas sem processamento prévio, utilizando diferentes estirpes hospedeiras. Amostras incubadas em meio BAT líquido, à temperatura ambiente, durante 24 h.

Estirpe hospedeira	Código da amostra ambiental testada	Número de placas fágicas detetadas por amostra ambiental testada
DSM 3922 <sup>T</sup>	19, 20, 21	0
TAB 21	19, 20, 21	0

As amostras ambientais analisadas neste trabalho foram sendo recolhidas e processadas ao longo do período experimental da tese, com o objetivo de aumentar a probabilidade de detecção de bacteriófagos ativos contra *Alicyclobacillus*. Os resultados apresentados nas tabelas correspondem, portanto, ao conjunto de ensaios realizados com diferentes amostras obtidas nesse intervalo temporal.

### 3.2 Purificação de placas fágicas

Para avaliar a natureza dos halos observados (Tabela 3.2) e verificar se correspondiam a placas fágicas, realizou-se o procedimento descrito na Seção 2.2.5, selecionando uma das placas fágicas mencionadas na Tabela 3.2. Inicialmente, a purificação foi realizada utilizando a mesma estirpe hospedeira (DSM 3922<sup>T</sup>) na qual as placas originais haviam sido detetadas. Foram realizadas várias tentativas, quer através da técnica de “spot plating”, quer por incorporação, porém sem sucesso, uma vez que não se verificou a formação de novas placas fágicas. Face a esta limitação, optou-se por avaliar a purificação numa estirpe hospedeira alternativa, de origem alimentar, designada TAB 21, de forma a perceber se teria suscetibilidade diferente à infecção por fagos. A Figura 3.1 ilustra os resultados obtidos.

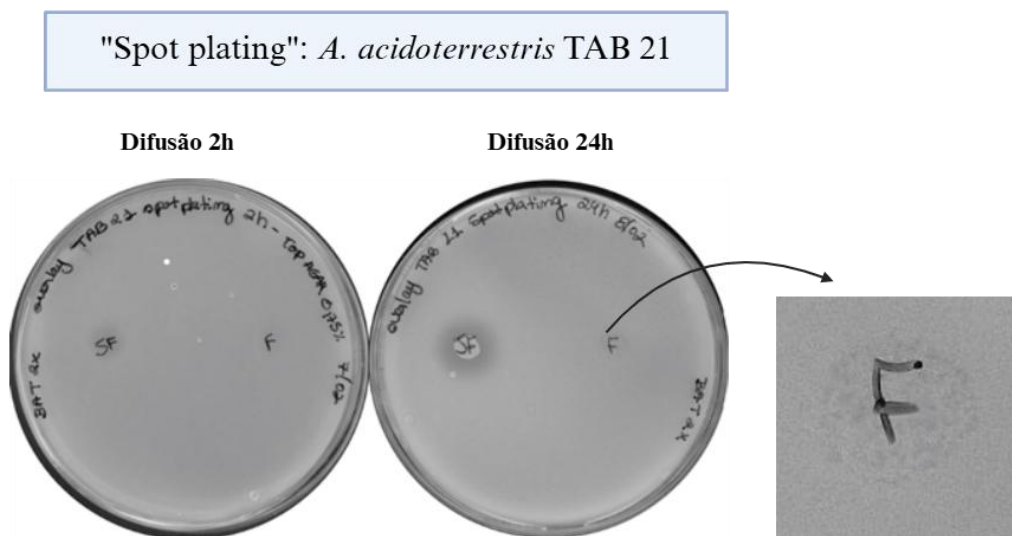


**Figura 3.1** - Isolamento de bacteriófagos a partir da Amostra 4 (solo de vinha) enriquecida, utilizando a estirpe *A. acidoterrestris* DSM 3922<sup>T</sup>. Subsequente tentativa de purificação de fagos utilizando a mesma estirpe hospedeira (DSM 3922<sup>T</sup>) e a estirpe TAB 21.

A Figura 3.1 mostra que, em contrapartida, a estirpe *A. acidoterrestris* TAB 21 mostrou ser suscetível ao fago em questão, com aparecimento de placas fágicas de diferentes dimensões, espaçadas entre si, com aparência difusa e distribuídas por toda a superfície da placa de Petri. Estes resultados sugerem que

a estirpe TAB 21 pode ser viável para reinfeção pelos fagos, sendo, por conseguinte, utilizada nos ensaios de purificação, amplificação e concentração das partículas fágicas.

Uma vez escolhida a estirpe hospedeira suscetível à reinfeção fágica, foram testadas condições de difusão dos bacteriófagos, que garantam a sua consistente recuperação a partir de placas fágicas. Para o efeito, foi utilizado o procedimento de purificação de bacteriófagos, descrito na secção 2.2.5. Foram postos a difundir em meio BAT líquido, fragmentos de uma placa fágica utilizando diferentes períodos de incubação (2 h e 24 h), o que permitiu avaliar qual das condições de difusão testadas seria a mais eficiente. Os eluídos foram testados utilizando a técnica de “spot plating” (secção 2.2.4), sendo testados diretamente (sem filtração) ou previamente filtrados, de modo a excluir a possibilidade de adesão dos fagos ao material do filtro. Os resultados podem ser observados na Figura 3.2.



**Figura 3.2** - Avaliação das condições de difusão de fagos por “spot plating” com a estirpe TAB. 21. SF – Sem filtração; F – Com filtração

Na Figura 3.2 consegue-se observar o aparecimento de um halo de inibição no eluído não filtrado com difusão durante 24 h. Este halo de inibição foi posteriormente estudado em mais detalhe pela equipa do laboratório, tendo sido confirmado que se deve à atividade de uma bacteriocina produzida pela estirpe *A. acidoterrestris* DSM 3922<sup>T</sup>; contudo, o estudo mais aprofundado desta proteína antimicrobiana não constitui o foco do presente trabalho. Por outro lado, ainda na difusão durante 24 h, o eluído filtrado apresentou pequenas zonas de inibição do crescimento da estirpe-alvo. Esta inibição de crescimento observada pode dever-se a uma sobreposição de placas fágicas ou, alternativamente, a uma bacteriocina residual possivelmente presente no sobrenadante.

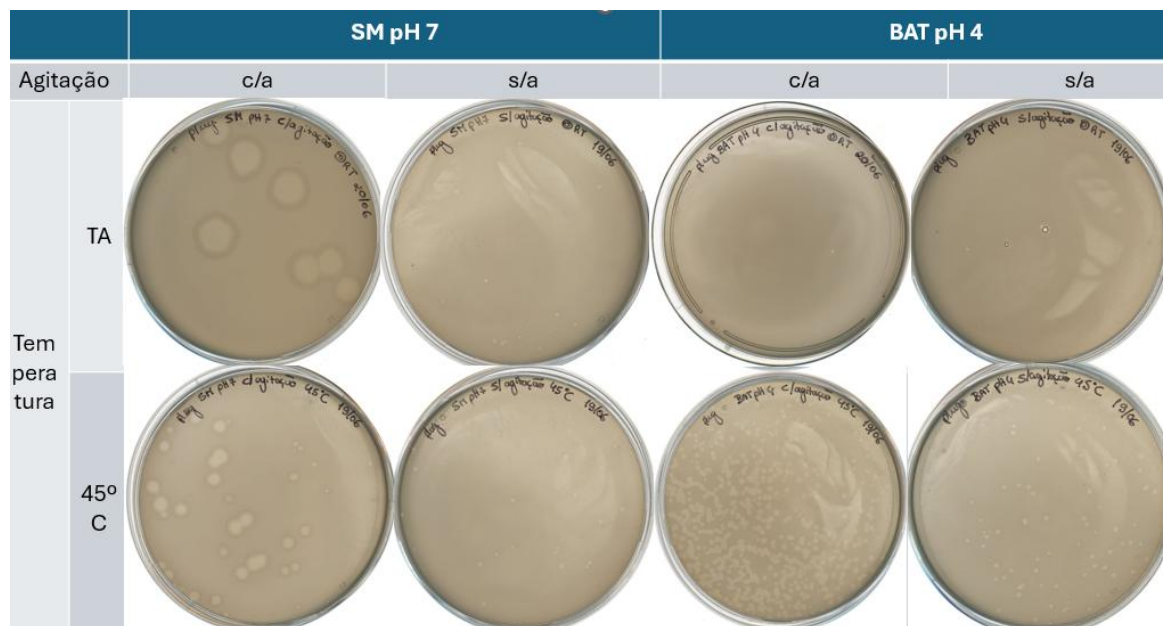
O eluído após difusão de 24 h e filtração foi subsequentemente utilizado em ensaios por incorporação. Estes ensaios corroboraram os resultados obtidos no “spot plating” visto que houve infeção fágica, com o aparecimento de novas placas fágicas. Após selecionar a difusão de 24 h como condição mais adequada, foram realizados pelo menos quatro ciclos consecutivos de purificação de placas fágicas isoladas, seguidos de difusão e incorporação, para garantir a obtenção de um isolado puro. O isolado final obtido correspondeu a uma única infeção inicial, garantindo que se tratava de um fago puro.

O tempo de difusão de 24 h escolhido no presente trabalho, contrasta com o trabalho de Shymialevich *et al.*, (2023) que difunde os fragmentos de placas fágicas durante apenas 2 h, enquanto Onallah *et al.*, (2024) sugere a difusão em meio líquido por cerca de 16 h.

### 3.3 Amplificação de bacteriófagos

Para a purificação de bacteriófagos, foi inicialmente utilizado o meio BAT líquido para a difusão de fragmentos de placas fágicas (secção 2.2.5). Contudo, a certo momento, levantou-se a questão de que o BAT líquido poderia não ser o mais adequado, dado o risco de permitir o crescimento de *A. acidoterrestris* TAB 21 durante o procedimento. Foram então realizados ensaios de otimização com diferentes soluções tamponadas, de modo a identificar a mais adequada para garantir simultaneamente uma difusão eficiente dos fragmentos de placas fágicas e a preservação da infeciosidade dos fagos neles contidos, tanto nos processos de purificação como nos de amplificação.

Foi testado o tampão SM frequentemente referido na literatura (Shymialevich *et al.*, 2023), para a difusão de fagos, sendo comparado com o meio BAT líquido, no qual o microrganismo em estudo apresenta crescimento favorável e no qual foram inicialmente observadas placas fágicas. A difusão dos fragmentos de placas fágicas foi avaliada em duas condições (Figura 3.3): tampão SM a pH 7 e meio BAT líquido a pH 4, em presença e ausência de agitação. Adicionalmente, testou-se o efeito da temperatura, realizando a difusão tanto à temperatura ambiente como a 45 °C.



**Figura 3.3** - Efeito das condições de crescimento (meio, pH, temperatura e agitação) na recuperação de fagos, em ensaios de dupla camada em placa de agar. TA – Temperatura ambiente; c/a - com agitação; s/a - sem agitação.

Os testes realizados mostraram que o meio BAT líquido a pH 4, sob agitação, a 45 °C foi o que conseguiu recuperar maior número de placas fágicas, com melhor distribuição entre si.

Apesar do tampão SM ser o mais frequentemente utilizado, nem sempre é a melhor opção, como demonstra o estudo feito por Huang *et al.*, (2025) que avaliou a estabilidade de quatro fagos em diferentes soluções de armazenamento e descobriu que o tipo de tampão de armazenamento tem um

impacto significativo na estabilidade do fago, tendo os fagos demonstrado maior viabilidade em meio LB (Luria Bertani) do que em tampão SM sem gelatina.

Para obtenção de volumes maiores e mais concentrados de lisado, recorreu-se ao método de inundação de placas "webbed". Estas foram inundadas com BAT líquido a pH 4 sob agitação, e o lisado recuperado foi submetido a diluições seriadas de 1:99 (v/v) com tampão SM e em BAT líquido ajustado a pH 4 e pH 7. Foram realizadas titulações das suspensões no dia da recuperação e após 14 dias (suspensões permaneceram guardadas a 4 °C), com o objetivo de avaliar a estabilidade da concentração fágica nas diferentes soluções de diluição ao longo do tempo (Tabela 3.4).

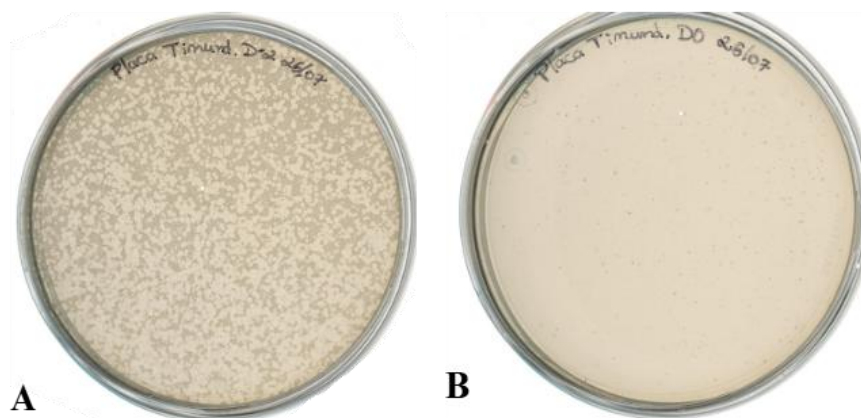
**Tabela 3.4** - Concentração de partículas fágicas (UFP/mL) em diferentes soluções diluentes e condições de pH, determinada no momento da recuperação (t0) e após 14 dias de armazenamento a 4°C (t14).

Solução de diluição	t0 (UFP/mL)	t14 (UFP/mL)	Porcentagem (%) de redução
<b>BAT líquido pH 7</b>	9,4 x 10 <sup>5</sup>	8,0 x 10 <sup>5</sup>	14,9
<b>BAT líquido pH 4</b>	4,8 x 10 <sup>5</sup>	3,5 x 10 <sup>5</sup>	27,1
<b>Tampão SM pH 7</b>	1,1 x 10 <sup>6</sup>	7,0 x 10 <sup>5</sup>	36,4
<b>Tampão SM pH 4</b>	4,2 x 10 <sup>5</sup>	1,3 x 10 <sup>5</sup>	69,0

Os resultados apresentados na Tabela 3.4 mostram que o meio BAT ajustado a pH 7 (redução de 14,9%) e a pH 4 (redução de 27,1%) evidenciaram a menor redução da concentração fágica após 14 dias de armazenamento, refletindo boa estabilidade dos fagos. Com base nesses dados, o BAT a pH 7 foi inicialmente selecionado como solução de difusão. No entanto, a inundação de placas "webbed" com este meio não permitiu a recuperação de partículas fágicas infecciosas, indicando que a boa estabilidade durante o armazenamento não garante necessariamente uma difusão eficiente ou um título suficientemente elevado para ensaios posteriores. Considerando que, no ensaio de difusão de fragmentos de placas fágicas (ensaio anterior), o BAT a pH 4 apresentou melhor desempenho, optou-se por manter este tampão como solução de difusão em todos os ensaios subsequentes, mantendo a consistência do uso do pH 4.

Estes resultados corroboram o estudo de Shymialevich *et al.* (2023), que avaliou a atividade do fago KKP 3916 em uma ampla gama de valores de pH (3-11) durante um período específico. Os resultados (títulos fágicos log UFP/mL) mostraram que o fago apresentou alta tolerância à acidez, não tendo havido diferenças estatisticamente significativas após a incubação do lisado em soluções com pH entre 3 e 11. No entanto, são necessários mais estudos para compreender completamente a influência do pH na difusão e eficácia dos fagos em meios líquidos.

Com o objetivo de obter um elevado volume de lisado, e após a escolha da diluição certa para a obtenção de placas "webbed", prepararam-se um conjunto destas placas (descrito na seção 2.2.6), as quais foram subsequentemente inundadas com meio BAT líquido e incubadas durante a noite. A Figura 3.4 apresenta dois exemplos de placas fágicas (A e B), sendo que a placa da Figura 3.4A mostra-se mais adequada para a inundação, dado que ainda contém regiões com crescimento bacteriano não infectado, garantindo assim um maior número de ciclos de replicação dos fagos, ao passo que a placa da Figura 3.4B apresenta-se completamente confluenta.



**Figura 3.4** - Exemplos de placas "webbed" obtidas após difusão e infecção fágica. (A) Placa parcialmente infetada, apresentando regiões com crescimento bacteriano residual, considerada mais adequada para o processo de inundação. (B) Placa completamente confluenta.

### 3.4 Cálculo do título fágico e obtenção de suspensão de fagos concentrada

Com o lisado recuperado das placas fágicas inundadas, procedeu-se à determinação do título fágico por titulação. Na diluição  $10^{-4}$  foi possível quantificar 90 unidades formadoras de placa (UFP), conforme apresentado na Tabela 3.5, o que corresponde a um título de  $9,0 \times 10^6$  UFP/mL. Este valor reflete o número de partículas virais infecciosas presentes no lisado, ou seja, aquelas capazes de infetar células hospedeiras e originar placas fágicas.

O lisado recuperado foi então concentrado (para a posterior extração dos ácidos nucleicos), durante a noite por centrifugação conforme descrito na secção 2.2.8, para a obtenção de uma suspensão de fagos concentrada. A centrifugação resultou na formação de um "pellet" contendo partículas fágicas e de um sobrenadante límpido, que foi descartado após análise do seu título fágico. Os valores obtidos podem ser observados na Tabela 3.5.

**Tabela 3.5** - Determinação do título fágico do lisado obtido a partir de placas "webbed" e do sobrenadante resultante do processo de concentração por centrifugação.

Placas "webbed"	Data de produção das placas	21/08/2024
Lisado	Data de inundação das placas	22/08/2024
Lisado	Volume (mL)	20
Lisado	Título (UFP/mL)	<b><math>9,0 \times 10^6</math></b>
Sobrenadante descartado	Volume (mL)	20
Sobrenadante descartado	Título (UFP/mL)	<b><math>1,0 \times 10^1</math></b>

Observando os resultados da Tabela 3.5, verifica-se que o sobrenadante apresentou um valor residual de apenas  $1,0 \times 10^1$  UFP/mL, indicando a presença de uma única placa fágica. Estes resultados sugerem

que o processo de concentração foi eficaz, dado que praticamente não permaneceram partículas virais no sobrenadante.

As frações às quais foram extraídos os ácidos nucleicos são resultantes de um protocolo estabelecido (secção 2.2.8) com etapas de concentração e ressuspensão, que possibilitou a rastreabilidade dos fagos e evitou o descarte de frações erradas (Tabela 3.6). Por essa razão, as frações descartadas foram consideradas, para que fosse possível avaliar se poderiam ainda conter partículas fágicas ativas e infecciosas.

Todas as frações foram tituladas, permitindo identificar aquela que apresentava o maior título fágico e comparar os valores obtidos com os resultados da extração de ácidos nucleicos. Os títulos fágicos encontram-se apresentados na Tabela 3.6.

**Tabela 3.6** - Títulos fágicos determinados para as três frações resultantes do processo de concentração e preparação para extração de ácidos nucleicos. Descartado I – Volume resultante da lavagem do tubo da centrifugação noturna; Descartado II – “pellet” resultante da nova centrifugação; Amostra I – Sobrenadante resultante da nova centrifugação.

Descartado I	Volume (mL)	0,6
Descartado I	Título (UFP/mL)	$1,5 \times 10^5$
Descartado II	Volume (mL)	0,6
Descartado II	Título (UFP/mL)	$9,7 \times 10^4$
Amostra I	Volume (mL)	0,6
Amostra I	Título (UFP/mL)	$1,3 \times 10^6$

A análise dos resultados apresentados na Tabela 3.6 revelou que o título fágico mais elevado foi observado na Amostra I ( $1,3 \times 10^6$  UFP/mL), enquanto o Descartado II apresentou o valor mais baixo ( $9,7 \times 10^4$  UFP/mL), correspondendo a uma diferença de aproximadamente 1 logaritmo, valor esse muito aproximado do Descartado I ( $1,5 \times 10^5$  UFP/mL). Tanto o Descartado I, como o Descartado II, apresentam cerca de 10 vezes menos fagos comparativamente com a Amostra I.

Estes resultados são compatíveis com o protocolo experimental, visto que a centrifugação noturna a 4 °C e 1500 g, promoveu a concentração de material no “pellet”, a ressuspensão de 2 h por sua vez, promoveu a passagem de fagos para a fase líquida e a centrifugação subsequente permitiu remover partículas insolúveis. Por outro lado, o título fágico do Descartado I sugere a presença residual de fagos aderidos às paredes do tubo de centrífuga, o que poderá estar associado à dificuldade na dissolução do “pellet” inicial, que se apresentou fragmentado e com aparência gelatinosa.

### 3.5 Extração de ácidos nucleicos

Antes da extração, as três frações sofreram um tratamento enzimático com DNase e RNase para garantir a digestão dos ácidos nucleicos bacterianos exógenos aos fagos presentes nas amostras.

A extração dos ácidos nucleicos foi feita com o kit PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit, de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, os ácidos nucleicos foram quantificados para determinar a sua natureza, ou seja, se se tratava de DNA ou RNA.

A quantificação (Tabela 3.7) foi efetuada recorrendo a duas metodologias (descritas na secção 2.3.2): espectrofotometria (NanoDrop) e fluorescência (Qubit), métodos complementares que permitem determinar a concentração e pureza das amostras.

Nas extrações de ácidos nucleicos inicialmente realizadas, foram efetuadas medições por fluorescência com diferentes kits do Qubit, de modo a discriminar o tipo de ácidos nucleicos presentes nas amostras. Os resultados obtidos com o dsDNA BR Assay Kit revelaram valores significativamente mais elevados de quantificação, enquanto os kits RNA BR Assay Kit e ssDNA Assay Kit apresentaram valores comparativamente negligíveis. Esta análise sugere que os bacteriófagos em estudo possuem genomas constituídos por DNA de dupla cadeia, pelo que, na Tabela 3.7, são apresentados apenas os resultados obtidos com o dsDNA BR Assay Kit.

**Tabela 3.7** - Quantificação e avaliação da pureza de ácidos nucleicos extraídos de frações de bacteriófagos. Os valores representam a concentração determinada por Qubit dsDNA e NanoDrop, bem como as razões 260 nm/280 nm e 260 nm/230 nm, utilizadas para avaliação da pureza das amostras.

Frações	Qubit dsDNA (ng/ µl)	Nanodrop (ng/µl)	Razão 260 nm / 280 nm	Razão 260 nm / 230 nm
Descartado I	4,14	6,2	1,72	1,54
Descartado II	0,794	0,6	0,99	0,94
Amostra I	66,0	130,2	1,76	1,25

Analisando os resultados da Tabela 3.7, verifica-se que a Amostra I destaca-se pela elevada concentração de DNA determinada pelo Qubit (66,0 ng/µl), assim como a medição por NanoDrop revelou um valor consideravelmente superior (130,2 ng/µl), comparativamente com as restantes amostras.

A razão 260 nm/280 nm próxima de 1,8 sugere um DNA relativamente puro, mas a razão 260 nm/230 nm de 1,25 permaneceu abaixo do intervalo ideal (2,0–2,2), indicando contaminação residual, provavelmente por compostos provenientes do processo de extração. A discrepância entre as quantificações feitas pelo Qubit e pelo Nanodrop relativas à Amostra I, aliada à razão 260 nm/230 nm inferior ao valor esperado para DNA puro, sugere a presença de contaminantes que inflacionam a leitura por absorvância, tornando provavelmente mais fiável a concentração determinada por Qubit.

Estes resultados condizem com o estudo de Jakočiūnė & Moodley (2018) que extraíram DNA de fagos de cadeia dupla, a partir de um título inicial acima  $1,0 \times 10^{10}$  UFP/mL e obtiveram valores de DNA entre 4,56 ng/µL e 287,35 ng/µL. Os resultados obtidos encontram-se na mesma gama de concentração reportada no estudo, apesar de neste trabalho se ter partido de títulos iniciais mais baixos (exceto no caso da Amostra I).

Conforme discutido anteriormente, a Amostra I, que possuiu maior quantidade de fagos infecciosos correspondeu à amostra que tem a maior quantidade de ácidos nucleicos extraídos e purificados. Em contrapartida, as frações restantes (Descartado I e Descartado II) mostraram menor quantidade de ácidos nucleicos, como era esperado.

A análise das frações extraídas por eletroforese em gel de agarose foi concordante com os resultados acima, pois a banda da Amostra I foi a mais intensa e demonstrou integridade do DNA sem arrastamento devido à degradação do material genético.

## 4 Conclusões e Perspetivas Futuras

O presente trabalho tinha como objetivo a criação de estratégias para a descoberta de bacteriófagos líticos que fossem capazes de infetar bactérias deteriorantes do género *Alicyclobacillus*. Adicionalmente, queriam ser encontradas metodologias que permitissem a caracterização fenotípica e molecular de fagos promissores e adequados para aplicações de biocontrolo e biopreservação na indústria alimentar e de bebidas.

Para poder cumprir o objetivo deste trabalho, foram recolhidas amostras de ambientes favoráveis à presença de *Alicyclobacillus* e que pudessem eventualmente conter fagos com a capacidade de infetar estas bactérias. De todas as amostras ambientais analisadas, só uma única amostra, proveniente de solo de vinha, é que levou ao aparecimento de placas fágicas, usando a estirpe *A. acidoterrestris* DSM 3922<sup>T</sup> como hospedeira. A mesma estirpe hospedeira não permitiu realizar os ciclos necessários à purificação do fago. A utilização de uma nova estirpe hospedeira, *A. acidoterrestris* TAB 21, revelou-se decisiva, possibilitando a purificação do fago após a realização das necessárias rondas de purificação. Além disso, foram avaliadas as diferentes condições que permitiram e interferiram com a difusão do fago de modo a possibilitar a sua recuperação, estabilidade e infeciosidade, garantindo a sua preservação e seu estudo.

A mesma estirpe, *A. acidoterrestris* TAB 21, permitiu a amplificação do fago purificado para a sua criopreservação, a sua caracterização e para outras restantes aplicações. Relativamente à caracterização molecular, o método de inundação permitiu alcançar títulos suficientemente elevados para a extração de ácidos nucleicos. As técnicas de espectrofotometria e fluorometria usadas para a qualificação e quantificação de ácidos nucleicos, mostraram que o material genético do fago era composto por DNA de dupla cadeia. A visualização em gel de agarose reforçou os resultados obtidos, bem como a integridade dos ácidos nucleicos extraídos. Os ensaios demonstraram ainda a reprodutibilidade do procedimento, confirmando a sua fiabilidade para aplicações subsequentes, como adicionais caracterizações moleculares e funcionais.

Para além dos resultados obtidos, este trabalho representou um contributo importante para o laboratório, ao permitir a implementação, pela primeira vez, de metodologias de microbiologia convencional aplicadas ao estudo de bacteriófagos. Foram desenvolvidos protocolos para processamento de amostras, “screening”, purificação e amplificação, criando competências até então inexistentes na equipa. Estes avanços conferiram independência técnica ao laboratório e abriram caminho para novas linhas de investigação. Os protocolos agora disponíveis constituem uma base sólida que pode ser aplicada a diferentes contextos, desde o biocontrolo em alimentos, tema desta dissertação, até a potenciais aplicações biomédicas.

Com base nos ácidos nucleicos extraídos, foi possível ao laboratório expandir este trabalho tendo-se realizado a sequenciação do fago isolado recorrendo à sequenciação de nova geração (NGS) utilizando “long reads” e “short reads”. Concluiu-se que o fago isolado, agora denominado *Alicyclobacillus* phage MMB025 pertence à classe *Caudoviricetes*, apresenta um espectro restrito de hospedeiros contra os quais é ativo, mantendo, no entanto, uma notável estabilidade ao longo de uma ampla gama de valores de pH (3 a 12) e temperaturas (até 1 h a 60 °C), incluindo aquelas habitualmente encontradas durante o processamento de sumos de fruta. A comparação entre a sequência genómica do fago e a do genoma de *A. acidoterrestris* DSM 3922<sup>T</sup> sugere que o MMB025 pode ter sido originado a partir de um evento de indução de um profago.

Futuras experiências direcionadas poderão clarificar as condições que o resultado da sequenciação mostrou e determinar se o fago consegue reentrar no estado lisogénico após indução ou se a excisão conduz de forma irreversível à replicação lítica e à formação de partículas. Ainda assim, o MMB025 destaca-se como fonte promissora de lisinas para o controlo da deterioração causada por *Alicyclobacillus* na indústria alimentar, além de poder ser geneticamente modificado para ampliar o seu espetro de hospedeiros e torná-lo estritamente lítico.

Em suma, este estudo evidencia o potencial dos fagos como estratégia alternativa de preservação industrial contra bactérias *Alicyclobacillus*, ainda pouco explorada em contextos alimentares. Reforça o papel pioneiro dos fagos no combate à deterioração de alimentos, amplia o conhecimento sobre a diversidade de fagos em *Alicyclobacillus* e estabelece bases para soluções de biocontrolo inovadoras e seguras (GRAS), capazes de melhorar a qualidade dos alimentos, reduzir perdas económicas e promover uma produção mais sustentável.

## 5 Referências

- World Health Organization. (2023). *Foodborne burden of diseases estimates*. <https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/topic-details/GHO/global-burden-of-foodborne-diseases>
- World Health Organization. (2024). *Food safety* [Fact sheet]. Acedido a 2 de março de 2024. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2023). *FAO strategic priorities for food safety within the FAO strategic framework 2022–2031*. <https://doi.org/10.4060/cc4040en>
- European Food Safety Authority, & European Centre for Disease Prevention and Control. (2023). *The European Union One Health 2022 zoonoses report* (EFSA Journal, 21(12), e8442). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8442>
- World Health Organization. (2015). *WHO's first ever global estimates of foodborne diseases find children under 5 account for almost one third of deaths*. <https://www.who.int/news/item/03-12-2015-who-s-first-ever-global-estimates-of-foodborne-diseases-find-children-under-5-account-for-almost-one-third-of-deaths>
- Lianou, A., Panagou, E. Z., & Nychas, G.-J. E. (2016). Microbiological spoilage of foods and beverages. In P. Subramaniam (Ed.), *The stability and shelf life of food* (2nd ed.). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100435-7.00001-0>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2025). *Foodborne Illness Source Estimates*. <https://www.cdc.gov/food-safety/php/data-research/foodborne-illness-sources/index.html>
- Bevilacqua, A., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M. (2017). *Index*. In A. Bevilacqua, M. R. Corbo, & M. Sinigaglia (Eds.), *The microbiological quality of food* (pp. 301–310). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100502-6.00030-3>
- Karant, S., Feng, S., Patra, D., & Pradhan, A. K. (2023). Linking microbial contamination to food spoilage and food waste: The role of smart packaging, spoilage risk assessments, and date labelling. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1198124>
- Sahu, M., & Bala, S. (2017). Food Processing, Food Spoilage and their Prevention: An Overview. *International Journal of Life-Sciences Scientific Research*, 3(1). <https://ijls.com/currentissue/Food Processing Food Spoilage their Prevention.pdf>
- Odeyemi, O. A., Alegbeleye, O. O., Strateva, M., & Stratev, D. (2020). Understanding spoilage microbial community and spoilage mechanisms in foods of animal origin. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(2), 311–331. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12526>
- FAO. (2011). *Global food losses and food waste: Extent, causes and prevention* (J. Gustavsson, Ed.). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Acedido a 23 setembro de 2024. <https://www.fao.org/4/mb060e/mb060e.pdf>

- Petruzzi, L., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., & Bevilacqua, A. (2017). Chapter 1 - Microbial Spoilage of Foods: Fundamentals. In A. Bevilacqua, M. R. Corbo, & M. Sinigaglia (Eds.), *The Microbiological Quality of Food* (pp. 1–21). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100502-6.00002-9>
- Snyder, A. B., Martin, N., & Wiedmann, M. (2024). Microbial food spoilage: Impact, causative agents and control strategies. *Nature Reviews Microbiology*, 22(9), 528–542. <https://doi.org/10.1038/s41579-024-01037-x>
- Taormina, P. J. (2021). Microbial Growth and Spoilage. In P. J. Taormina, & M.D. Hardin (Eds.), *Food Safety and Quality-Based Shelf Life of Perishable Foods* (pp. 41–69). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-54375-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-54375-4_3)
- Sousa Gallagher, M. J., Mahajan, P. V., & Yan, Z. (2011). 14—Modelling chemical and physical deterioration of foods and beverages. In D. Kilcast & P. Subramaniam (Eds.), *Food and Beverage Stability and Shelf Life* (pp. 459–481). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9780857092540.2.459>
- Kong, F., & Singh, R. P. (2016). 2—Chemical Deterioration and Physical Instability of Foods and Beverages. In P. Subramaniam (Ed.), *The Stability and Shelf Life of Food* (Second Edition) (pp. 43–76). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100435-7.00002-2>
- Bento de Carvalho, T., Silva, B. N., Tomé, E., & Teixeira, P. (2024). Preventing Fungal Spoilage from Raw Materials to Final Product: Innovative Preservation Techniques for Fruit Fillings. *Foods*, 13(17), 2669. <https://doi.org/10.3390/foods13172669>
- Sourri, P., Tassou, C. C., Nychas, G.-J. E., & Panagou, E. Z. (2022). Fruit Juice Spoilage by *Alicyclobacillus*: Detection and Control Methods—A Comprehensive Review. *Foods*, 11(5), 747. <https://doi.org/10.3390/foods11050747>
- Singh, R. P., & Anderson, B. A. (2004). The major types of food spoilage: An overview. In R. Steele (Ed.), *Understanding and measuring the shelf-life of food* (pp. 3–23). Woodhead Publishing. <https://www.sciencedirect.com/book/edited-volume/9781855737327/understanding-and-measuring-the-shelf-life-of-food>
- Sperber, W. H. (2009). Introduction to the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages. In W. H. Sperber & M. Doyle (Eds.), *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages* (pp. 1–40). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0826-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0826-1_1)
- Pornpukdeewattana, S., Jindaprasert, A., & Massa, S. (2020). *Alicyclobacillus* spoilage and control—a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(1), 108–122. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1516190>
- Sokołowska, B., Połaska, M., & Dekowska, A. (2020). *Alicyclobacillus*—Still current issues in the beverage industry. In A. M. Grumezescu & A. M. Holban (Eds.), *Safety Issues in Beverage Production* (pp. 105–146). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816679-6.00004-8>
- Cerny, G., Hennlich, W., & Poralla, K. (1984). Spoilage of fruit juice by Bacilli: Isolation and characterization of the spoiling microorganisms. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung*, 179(3), 224–227. <https://doi.org/10.1007/BF01041898>

- Huertas, J.-P., Esteban, M.-D., Antolinos, V., & Palop, A. (2014). Combined Effect of natural antimicrobials and thermal treatments on *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. *Food Control*, 35(1), 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.051>
- Merle, J., & Montville, T. J. (2014). *Alicyclobacillus acidoterrestris*: The organism, the challenge, potential interventions. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38(1), 153–158. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2012.00758.x>
- Steyn, C. E., Cameron, M., & Witthuhn, R. C. (2011). Occurrence of *Alicyclobacillus* in the fruit processing environment—A review. *International Journal of Food Microbiology*, 147(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.004>
- Huang, X.-C., Yuan, Y.-H., Guo, C.-F., Gekas, V., & Yue, T.-L. (2015). *Alicyclobacillus* in the fruit juice industry: Spoilage, detection, and prevention/control. *Food Reviews International*, 31(2), 91–124. <https://doi.org/10.1080/87559129.2014.974266>
- Chang, S.-S., & Kang, D.-H. (2004). *Alicyclobacillus* spp. in the fruit juice industry: History, characteristics, and current isolation/detection procedures. *Critical Reviews in Microbiology*, 30(2), 55–74. <https://doi.org/10.1080/10408410490435089>
- Neggazi, I., Colás-Medà, P., Viñas, I., Garza, S., & Alegre, I. (2023). Occurrence of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in pasteurized and high hydrostatic pressure-treated fruit juices and isolates' characterization. *International Journal of Food Microbiology*, 396, 110197. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110197>
- Gordon, A. (2017). Introduction: effective implementation of food safety and quality systems: prerequisites and other considerations. In A. Gordon (Ed.), *Food safety and quality systems in developing countries: Volume two: Case studies of effective implementation* (pp. 1–19). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801226-0.00001-3>
- Smit, Y., Cameron, M., Venter, P., & Witthuhn, R. C. (2011). *Alicyclobacillus* spoilage and isolation—A review. *Food Microbiology*, 28(3), 331–349. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.11.008>
- Ciuffreda, E., Bevilacqua, A., Sinigaglia, M., & Corbo, M. R. (2015). *Alicyclobacillus* spp.: New insights on ecology and preserving food quality through new approaches. *Microorganisms*, 3(4), 625–640. <https://doi.org/10.3390/microorganisms3040625>
- Wisotzkey, J. D., Jurtshuk, P., Fox, G. E., Deinhard, G., & Poralla, K. (1992). Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 42(2), 263–269. <https://doi.org/10.1099/00207713-42-2-263>
- Albuquerque, L., Rainey, F. A., Chung, A. P., Sunna, A., Nobre, M. F., Grote, R., Antranikian, G., & da Costa, M. S. (2000). *Alicyclobacillus hesperidum* sp. nov. and a related genomic species from solfataric soils of São Miguel in the Azores. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(Pt 2), 451–457. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-2-451>
- Goto, K., Matsubara, H., Mochida, K., Matsumura, T., Hara, Y., Niwa, M., & Yamasato, K. (2002). *Alicyclobacillus herbarius* sp. nov., a novel bacterium containing omega-cycloheptane fatty acids,

isolated from herbal tea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(Pt 1), 109–113. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-1-109>

Matsubara, H., Goto, K., Matsumura, T., *et al.* (2002). *Alicyclobacillus acidiphilus* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, omega-alicyclic fatty acid-containing bacterium isolated from acidic beverages. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(Pt 5), 1681–1685. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-5-1681>

Bucka-Kolendo, J., Kiouisi, D. E., Dekowska, A., *et al.* (2024). Exploration of *Alicyclobacillus* spp. genome in search of antibiotic resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(15), 8144. <https://doi.org/10.3390/ijms25158144>

Darland, G., & Brock, T. D. (1971). *Bacillus acidocaldarius* sp. nov., an acidophilic thermophilic spore-forming bacterium. *Journal of General Microbiology*, 67(1), 9–15. <https://doi.org/10.1099/00221287-67-1-9>

Groenewald, W. H., Gouws, P. A., & Witthuhn, R. C. (2008). Isolation and identification of species of *Alicyclobacillus* from orchard soil in the Western Cape, South Africa. *Extremophiles: Life Under Extreme Conditions*, 12(1), 159–163. <https://doi.org/10.1007/s00792-007-0112-z>

Anjos, M. M., Ruiz, S. P., & Abreu Filho, B. A. (2014). Evaluation of different culture media and enrichment in orange juice upon the growth of *Alicyclobacillus* spp. *Arquivos do Instituto Biológico*, 81(2), 113–118. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000562012>

Murray, M. B., Gurtler, J. B., Ryu, J.-H., Harrison, M. A., & Beuchat, L. R. (2007). Evaluation of direct plating methods to enumerate *Alicyclobacillus* in beverages. *International Journal of Food Microbiology*, 115(1), 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.025>

Henczka, M., Djas, M., & Filipek, K. (2013). Optimisation of a direct plating method for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. *Journal of Microbiological Methods*, 92(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.10.007>

Poralla, K., Kannenberg, E., & Blume, A. (1980). A glycolipid containing hopane isolated from the acidophilic, thermophilic *Bacillus acidocaldarius*, has a cholesterol-like function in membranes. *FEBS Letters*, 113(1), 107–110. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(80\)80506-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(80)80506-0)

Rolfe, M. D., Rice, C. J., Lucchini, S., *et al.* (2012). Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation. *Journal of Bacteriology*, 194(3), 686–701. <https://doi.org/10.1128/JB.06112-11>

McKenney, P. T., Driks, A., & Eichenberger, P. (2013). The *Bacillus subtilis* endospore: Assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews Microbiology*, 11(1), 33–44. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2921>

Cai, R., Yuan, Y., Wang, Z., *et al.* (2015). Precursors and metabolic pathway for guaiacol production by *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *International Journal of Food Microbiology*, 214, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.028>

- Witthuhn, R. C., Smit, Y., Cameron, M., & Venter, P. (2013). Guaiacol production by *Alicyclobacillus* and comparison of two guaiacol detection methods. *Food Control*, 30(2), 700–704. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.07.050>
- Bahçeci, K. S., Gökmen, V., & Acar, J. (2005). Formation of guaiacol from vanillin by *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice: A model study. *European Food Research and Technology*, 220(2), 196–199. <https://doi.org/10.1007/s00217-004-1018-y>
- Yue, T., Jiangbo, Z., & Yahong, Y. (2014). Spoilage by *Alicyclobacillus* bacteria in juice and beverage products: Chemical, physical, and combined control methods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(5), 771–797. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12093>
- Wurlitzer, N. J., Dionísio, A. P., Lima, J. R., Garruti, D. D. S., Silva Araújo, I. M. D., da Rocha, R. F. J., & Maia, J. L. (2019). Tropical fruit juice: Effect of thermal treatment and storage time on sensory and functional properties. *Journal of Food Science and Technology*, 56(12), 5184–5193. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03987-0>
- Mandha, J., Shumoy, H., Matem, A. O., & Raes, K. (2023). Characterization of fruit juices and effect of pasteurization and storage conditions on their microbial, physicochemical, and nutritional quality. *Food Bioscience*, 51, 102335. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102335>
- Silva, F. V. M., Tan, E. K., & Farid, M. (2012). Bacterial spore inactivation at 45–65 °C using high pressure processing: Study of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in orange juice. *Food Microbiology*, 32(1), 206–211. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.04.019>
- Baysal, A. H., Molva, C., & Unluturk, S. (2013). UV-C light inactivation and modeling kinetics of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in white grape and apple juices. *International Journal of Food Microbiology*, 166(3), 494–498. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.015>
- Tremarin, A., Brandão, T. R. S., & Silva, C. L. M. (2015). Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice under ultraviolet irradiation treatments. In E. Dermesonlouoglou, V. Giannou, E. Gogou, & P. Taoukis (Eds.), *Food Science Research and Innovation: Delivering sustainable solutions to the global economy and society* (pp. 159–163) <http://hdl.handle.net/10400.14/19819>
- Kim, N. H., Ryang, J. H., Lee, B. S., Kim, C. T., & Rhee, M. S. (2017). Continuous ohmic heating of commercially processed apple juice using five sequential electric fields results in rapid inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. *International Journal of Food Microbiology*, 246, 80–84. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.01.002>
- Wang, J., Zhao, G., Liao, X., & Hu, X. (2010). Effects of microwave and ultrasonic wave treatment on inactivation of *Alicyclobacillus*. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(3), 459–465. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02144.x>
- Maldonado, M. C., Aban, M. P., & Navarro, A. R. (2014). Chemicals and lemon essential oil effect on *Alicyclobacillus acidoterrestris* viability. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(4), 1133–1137. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822013000400015>

- EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), Younes, M., Aggett, P., *et al.* (2017). Safety of nisin (E 234) as a food additive in the light of new toxicological data and the proposed extension of use. *EFSA Journal*, *15*(12), e05063. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5063>
- Pei, J., Yue, T., & Yuan, Y. (2014). Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices by a newly discovered bacteriocin. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *30*(3), 855–863. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1491-1>
- Bevilacqua, A., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M. (2011). Use of essential oils to inhibit *Alicyclobacillus acidoterrestris*: A short overview of the literature. *Frontiers in Microbiology*, *2*, 195. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00195>
- Piskernik, S., Klančnik, A., Demšar, L., Smole Možina, S., & Jeršek, B. (2016). Control of *Alicyclobacillus* spp. vegetative cells and spores in apple juice with rosemary extracts. *Food Control*, *60*, 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.07.018>
- Batinovic, S., Wassef, F., Knowler, S. A., *et al.* (2019). Bacteriophages in natural and artificial environments. *Pathogens*, *8*(3), 100. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030100>
- Rendueles, C., Duarte, A. C., Escobedo, S., Fernández, L., Rodríguez, A., García, P., & Martínez, B. (2022). Combined use of bacteriocins and bacteriophages as food biopreservatives: A review. *International Journal of Food Microbiology*, *368*, 109611. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109611>
- Maffei, E., Shaidullina, A., Burkolter, M., *et al.* (2021). Systematic exploration of *Escherichia coli* phage–host interactions with the BASEL Phage Collection. *PLOS Biology*, *19*(11), e3001424. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001424>
- Mourosi, J. T., Awe, A., Guo, W., *et al.* (2022). Understanding bacteriophage tail fiber interaction with host surface receptor: The key “blueprint” for reprogramming phage host range. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(20), 12146. <https://doi.org/10.3390/ijms232012146>
- Vikram, A., Woolston, J., & Sulakvelidze, A. (2021). Phage biocontrol applications in food production and processing. *Current Issues in Molecular Biology*, *40*(1), 267–302. <https://doi.org/10.21775/cimb.040.267>
- Osei, E. K., Mahony, J., & Kenny, J. G. (2022). From farm to fork: *Streptococcus suis* as a model for the development of novel phage-based biocontrol agents. *Viruses*, *14*(9), 1996. <https://doi.org/10.3390/v14091996>
- U.S. Food and Drug Administration. (2013/2024). *GRAS Notice No. 000435: Preparation consisting of six bacterial monophage specific to Salmonella enterica*. Acedido a 25 de março de 2025. <https://www.fda.gov/media/177133/download>
- Pońska, M., & Sokołowska, B. (2019). Bacteriophages—a new hope or a huge problem in the food industry. *AIMS Microbiology*, *5*(4), 324–346. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2019.4.324>
- Sakaki, Y., Oshima, M., Yamada, K., & Oshima, T. (1977). Bacteriophage phiNS11: A lipid-containing phage of acidophilic thermophilic bacteria. III. Characterization of viral components. *The Journal of Biochemistry*, *82*(5), 1457–1461. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a131834>

Shymialevich, D., Wójcicki, M., Świder, O., Średnicka, P., & Sokołowska, B. (2023). Characterization and genome study of a newly isolated temperate phage belonging to a new genus targeting *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Genes*, *14*(6), 1303. <https://doi.org/10.3390/genes14061303>

SeaPhages. (n.d.). *6.4 Protocol*. SeaPhages Phage Discovery Guide. Disponível em <https://seaphagesphagediscoveryguide.helpdocsonline.com/6-4-protocol>

Baer, A., & Kehn-Hall, K. (2014). Viral concentration determination through plaque assays: Using traditional and novel overlay systems. *Journal of Visualized Experiments (JoVE)*, *93*, 52065. <https://doi.org/10.3791/52065>

Santamaría, R. I., Bustos, P., Sepúlveda-Robles, O., Lozano, L., Rodríguez, C., *et al.* (2014). Narrow-host-range bacteriophages that infect *Rhizobium etli* associate with distinct genomic types. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(2), 446–454. <https://doi.org/10.1128/AEM.02256-13>

Onallah, H., Yerushalmy, O., Braunstein, R., *et al.* (2024). Protocol for phage matching, treatment, and monitoring for compassionate bacteriophage use in non-resolving infections. *STAR Protocols*, *5*(2), 102949. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2024.102949>

Huang, W., Khan Mirzaei, M., & Deng, L. (2025). Comparative evaluation of long-term preservation methods for morphologically distinct bacteriophages. *Microbiology Spectrum*, *13*(7), e0144224. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01442-24>

Jakočiūnė, D., & Moodley, A. (2018). A rapid bacteriophage DNA extraction method. *Methods and Protocols*, *1*(3), 27. <https://doi.org/10.3390/mps1030027>