

Potencial atenuação da virulência de *Aliarcobacter butzleri* por probióticos

Versão final pós defesa

Alexandre Almeida Vieira

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2^o ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutora Susana Margarida Paraíso Ferreira
Co-orientadoras: Prof. Doutora Fernanda da Conceição Domingues
Doutora Mónica Alexandra de Sousa Oleastro

julho de 2024

Declaração de Integridade

Eu, Alexandre Almeida Vieira, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M11287 do Mestrado em Bioquímica da Faculdade de Ciências, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referência de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 24 / 07 / 2024

Alexandre Almeida Vieira

(assinatura conforme Cartão de Cidadão ou preferencialmente
assinatura digital no documento original se naquele mesmo formato)

Dedicatória

Para os meus Pais e Irmão

Agradecimentos

Queria primeiramente agradecer a minha orientadora, Professora Doutora Susana Ferreira, por ter aceitado orientar-me, pela enorme paciência que teve comigo ao longo deste trabalho todo, pela ajuda e disponibilidade, pelos ensinamentos e conhecimento que transmitiu ao longo deste trabalho.

Agradeço também as minhas coorientadoras, Professora Doutora Fernanda Domingues e Doutora Mónica Oleastro, por todo o apoio e disponibilidade, todos os conselhos que ajudaram este trabalho a ser melhor.

Agradeço a possibilidade de ter realizado este trabalho à Universidade da Beira Interior e ao Centro de Investigação em Ciências da Saúde e também ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

Gostaria de agradecer aos meus colegas de laboratório, pela ajuda, paciência, as brincadeiras e parvoíces que tornam os dias mais difíceis de trabalho mais fáceis e claro pelas amizades que vou levar desta etapa na minha vida.

Agradecer aos meus colegas de casa que lidaram com os meus stresses todos e ajudaram imenso para que eu concluísse este trabalho.

Também agradecer aos meus amigos mais próximos que foram um pilar importante na realização desta etapa na minha vida, levantando-me o animo nos momentos mais difíceis, ajudando sempre que preciso, tenho imensa sorte em ter amigos como vocês.

E por último, mas não menos importante agradecer a minha família que sem eles nada disto teria sido possível, por me terem ajudado e aturado estes anos todos sendo o maior apoio que eu poderia pedir.

Resumo

Aliarcobacter butzleri é uma bactéria de Gram-negativo, pertencente ao gênero *Aliarcobacter* e à família *Arcobacteraceae*, que foi descrita pela Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas de Alimentos como sendo de risco moderado para a saúde humana. *A. butzleri* é considerado um enteropatógeno e como tal deve atravessar o trato gastrointestinal para atingir o local de colonização. Ao atravessar o trato gastrointestinal esta poderá encontrar uma variedade de barreiras de diferentes origens como o pH, os sais biliares ou probióticos. Os probióticos são bactérias consideradas benéficas para a saúde humana, podendo afetar a virulência das bactérias patogênicas. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos dos probióticos na sobrevivência e virulência de *A. butzleri*. Para tal começou por se avaliar os efeitos das condições de crescimento das espécies de probióticos, neste caso “lactobacilos”, em estudo (*Lactiplantibacillus plantarum*, *Limosilactobacillus reuteri* e *Lactobacillus acidophilus*), no crescimento, e efeito inibitório do sobrenadante sobre quatro estirpes de *A. butzleri*. No geral, não se verificou uma diferença significativa na inibição de crescimento de *A. butzleri*. De seguida, a tolerância das quatro estirpes de *A. butzleri* e das três espécies de “lactobacilos” a pH ácido e a sais biliares foi analisada, com os resultados demonstrando uma maior resistência das espécies de “lactobacilos” a pH ácido quando comparado com *A. butzleri*, mas uma maior suscetibilidade aos ácidos biliares. No entanto, dependendo das condições ambos os microrganismos poderão ser capazes de ultrapassar as condições adversas do percurso do trato gastrointestinal. O efeito dos sobrenadantes livres de células (SLC) dos probióticos no crescimento de *A. butzleri* foi explorado, tendo-se observado um efeito de inibição sobre o crescimento, provavelmente devido as alterações de pH no meio causadas pelas espécies probióticas em estudo. Também, quando em cocultura ocorre uma inibição do crescimento de *A. butzleri* com todas as espécies de “lactobacilos” em estudo. Por sua vez, quando é estudado o efeito dos SLC dos “lactobacilos” na formação de biofilme de *A. butzleri*, os resultados são variáveis, dependendo da espécie em estudo, existindo potenciação, inibição ou não havendo alteração da formação de biofilme de *A. butzleri*. No entanto, salienta-se o potencial de potenciação da formação de biofilme do SLC de *L. plantarum*. Por último foi avaliado o efeito dos “lactobacilos” na virulência de *A. butzleri*, na competição, deslocamento e exclusão por adesão e invasão a células Caco-2. Quando em competição, verificou-se uma incapacidade de as espécies probióticas afetarem a adesão da estirpe de *A. butzleri*, tendo-se observado, no entanto, um efeito inibitório de *A. butzleri* na adesão de *L. acidophilus* e de *L. plantarum*. No ensaio de deslocamento e

exclusão foi demonstrado uma diminuição da adesão de *A. butzleri*, ocorrendo deslocamento pelas três estirpes de lactobacilos, mas com *L. acidophilus* sendo incapaz de levar a exclusão da adesão de *A. butzleri*. Quanto ao processo de invasão não se observou efeito, quer no ensaio de competição, quer no de deslocamento ou exclusão. Em suma, neste trabalho foi demonstrado que os probióticos poderão ter um importante papel na limitação do crescimento de *A. butzleri*, e mesmo na resistência à colonização, mas não nas características de virulência avaliadas, como a formação de biofilme, pelo que ainda serão necessários estudos adicionais para complementar e clarificar estes resultados.

Palavras-chave

Aliarcobacter butzleri; Probióticos; Sobrevivência; Virulência

Abstract

Aliarcobacter butzleri is a Gram-negative bacterium, belonging to the genus *Aliarcobacter* and the *Arcobacteraceae* family, which was described by the International Commission on Microbiological Food Specifications as being of moderate risk to human health. *A. butzleri* is considered an enteropathogen and to reach the site of colonization must cross the gastrointestinal tract. When crossing the gastrointestinal tract, it may encounter a variety of barriers of different origins, such as pH, bile salts or probiotics. Probiotics are bacteria considered beneficial to human health and can affect the virulence of pathogenic bacteria. Therefore, this work aimed to evaluate the effects of probiotics on the survival and virulence of *A. butzleri*. To this end, we began by evaluating the effects of the growth conditions of the probiotic species, in this case “lactobacilli”, under study (*Lactiplantibacillus plantarum*, *Limosilactobacillus reuteri* and *Lactobacillus acidophilus*), on the growth and the inhibitory effect of the supernatant on four strains of *A. butzleri*, with no significant difference being observed in the inhibition of growth of *A. butzleri*. Next, the tolerance of the four strains of *A. butzleri* and the three species of “lactobacilli” to acidic pH and bile salts was analyzed, with the results demonstrating greater resistance of the “lactobacilli” species to acidic pH when compared to *A. butzleri*, but a greater susceptibility to bile acids. However, depending on the conditions, both microorganisms may be able to overcome the adverse conditions of the gastrointestinal tract. The effect of cell-free supernatants (CFS) of probiotics on the growth of *A. butzleri* was explored, and an inhibition effect on growth was observed, probably due to pH changes in the medium caused by the probiotic species under study. Also, when in coculture there is an inhibition of the growth of *A. butzleri* with all species of “lactobacilli” under study. In turn, when the effect of CFS from “lactobacilli” is studied on *A. butzleri* biofilm formation, varying results occur depending on the species under study, with potentiation, inhibition or no change in *A. butzleri* biofilm formation. However, the potential to enhance biofilm formation of *L. plantarum* CFS is highlighted. Finally, the effect of “lactobacilli” on the virulence of *A. butzleri* in competition, displacement and exclusion by adhesion and invasion of Caco-2 cells was evaluated. When in competition, there was an inability for probiotic species to affect the adhesion of the *A. butzleri* strain, although *A. butzleri* had an inhibitory effect on the adhesion of *L. acidophilus* e de *L. plantarum* .. In the displacement and exclusion assay, a decrease in the adhesion of the *A. butzleri* strain was demonstrated, with displacement occurring by the three lactobacilli strains, but with *L. acidophilus* being unable to lead to the exclusion of *A. butzleri* adhesion. Regarding invasion, no effect was observed in competition,

displacement or exclusion tests. In sum, in this work it was demonstrated that probiotics may have an important role in limiting the growth of *A. butzleri* and even in resistance to colonization, but not in the studied virulence traits, such as biofilm formation, so additional studies will still be needed to complement and clarify these results.

Keywords

Aliarcobacter butzleri; Probiotics; Survival; Virulence

Índice

Capítulo 1 - Introdução	1
1.1. Género <i>Aliarcobacter</i>	1
1.1.1. História e taxonomia do género <i>Aliarcobacter</i>	1
1.1.2. Características gerais de <i>Aliarcobacter butzleri</i>	2
1.1.3. Distribuição e vias de transmissão de <i>Aliarcobacter</i>	2
1.1.3.1. Transmissão de <i>Aliarcobacter</i> através da água	3
1.1.3.2. Transmissão de <i>Aliarcobacter</i> através de alimentos	4
1.1.3.3. Transmissão de <i>Aliarcobacter</i> através de contacto pessoa-a-pessoa ..	4
1.1.3.4. Transmissão de <i>Aliarcobacter</i> através de contacto com animais	5
1.2. Patogenicidade e fatores de virulência de <i>Aliarcobacter butzleri</i>	5
1.2.1. Patogenicidade de <i>Aliarcobacter butzleri</i>	5
1.2.2. Capacidade da formação de biofilmes.....	6
1.2.3. Capacidade de adesão e invasão a células eucarióticas	6
1.3. Trato gastrointestinal.....	8
1.4. Probióticos	9
1.5. “Lactobacilos”.....	11
1.5.1. História e Taxonomia	11
1.5.2 Características gerais dos “lactobacilos”	12
1.5.3. “Lactobacilos” como probióticos	13
Capítulo 2 - Objetivos	15
Capítulo 3 - Materiais e métodos.....	16
3.1. Estirpes bacterianas usadas no estudo	16
3.2. Condições de armazenamento e crescimento das estirpes	16
3.3. Avaliação do crescimento de lactobacilos	16
3.4. Avaliação de sobrevivência a ambientes acídicos.....	17
3.5. Avaliação da suscetibilidade a sais biliares	17
3.6. Difusão em poço e avaliação de crescimento de <i>Aliarcobacter butzleri</i> nos sobrenadantes livres de células de “lactobacilos”	18

3.7. Cocultura de <i>Aliarcobacter butzleri</i> com cada um dos probióticos em estudo	19
3.8. Avaliação do efeito do SLC na formação de biofilmes	19
3.9 Avaliação da adesão de <i>Aliarcobacter butzleri</i> e estirpes de “lactobacilos” à linha celular Caco-2	20
3.10. Avaliação da competição, deslocamento e exclusão de <i>Aliarcobacter butzleri</i> com as estirpes de “lactobacilos” na adesão e invasão à linha celular Caco-2	21
Capítulo 4 - Resultados e Discussão	23
4.1. Seleção das condições do crescimento das estirpes de “lactobacilos” em estudo	23
4.2. Resistência das bactérias a condições adversas encontradas no trato gastrointestinal.....	25
4.3.1. Avaliação de sobrevivência a ambientes acídicos	25
4.3.2. Avaliação da suscetibilidade a sais biliares	27
4.3. Avaliação do crescimento de <i>Aliarcobacter butzleri</i> na presença de sobrenadante livre de células produzidos pelos “lactobacilos” em estudo	29
4.4. Cocultura de <i>Aliarcobacter butzleri</i> com cada uma das estirpes de “lactobacilos” em estudo	31
4.5 Avaliação do efeito do sobrenadante livre de células na formação de biofilmes	35
4.5 Avaliação da adesão de <i>Aliarcobacter butzleri</i> e estirpes de “lactobacilos” à linha celular Caco-2	37
4.6 Avaliação da competição, deslocamento e exclusão de <i>Aliarcobacter butzleri</i> com as estirpes de probióticos na adesão e invasão à linha celular Caco-2.....	38
Capítulo 5 - Conclusão	46
Capítulo 6 - Perspetivas futuras.....	48
Bibliografia	49

Lista de Figuras

Figura 1 – Diâmetro de inibição dos sobrenadantes livre de células produzidos pelas estirpes de “lactobacilos” em diversas condições de incubação sobre as estirpes de <i>Aliarcobacter butzleri</i> em estudo, Ab28/11 (A), DQ40A1 (B), INSA 2999 (C), INSA 2756 (D).....	24
Figura 2 – Sobrevivência de <i>Aliarcobacter butzleri</i> Ab28/11 (A), DQ40A1 (B), INSA 2999 (C), INSA 2756 (D) a pH ácido de pH 4, 3,5, 3, 2,5 durante 2 horas.....	26
Figura 3 – Sobrevivência das estirpes <i>Limosilactobacillus reuteri</i> ATCC 23272 (A), <i>Lactobacillus acidophilus</i> LMG 9433 (B) e <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ATCC 8014 (C) a pH ácido de pH 4, 3,5, 3, 2,5 durante 2 horas.....	27
Figura 4 – Efeito do sobrenadante livre de células <i>Limosilactobacillus reuteri</i> (A), <i>Lactobacillus acidophilus</i> (B) e <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (C) na estirpe <i>Aliarcobacter butzleri</i> AB28/11, em diferentes concentrações, usado sem tratamento com o pH variando de 3 a 4 ou ajustando o pH a 5,5 ou a 7.....	30
Figura 5 – Efeito do sobrenadante livre de células de <i>Limosilactobacillus reuteri</i> (A), <i>Lactobacillus acidophilus</i> (B) e <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (C) sobre <i>Aliarcobacter butzleri</i> AB28/11, em diferentes concentrações, usado sem tratamento, após tratamento a 100°C.....	30
Figura 6 – Cultura de <i>Aliarcobacter butzleri</i> e <i>Limosilactobacillus reuteri</i> e cocultura de <i>A. butzleri</i> e <i>Limosilactobacillus reuteri</i> , em diferentes meios de cultura, TSB (A), MRS (B) ou TSB e MRS (C) na proporção de 1:1 durante 48 horas.....	32
Figura 7 – Cultura de <i>A. butzleri</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i> e cocultura de <i>A. butzleri</i> com <i>Lactobacillus acidophilus</i> , em diferentes meios de cultura, TSB (A), MRS (B) ou TSB e MRS (C) na proporção de 1:1 durante 48 horas.....	33
Figura 8 – Cultura de <i>A. butzleri</i> e <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> e cocultura de <i>A. butzleri</i> e <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> , em diferentes meios de cultura, TSB (A), MRS (B) ou TSB e MRS (C) na proporção de 1:1 durante 48 horas.....	34
Figura 9 – Efeito dos SLC das estirpes de “lactobacilos” na formação de biofilme de <i>Aliarcobacter butzleri</i> AB28/11, considerando a formação de biofilme assumindo a absorvância a 570nm (A) e a absorvância a 570nm com o SLC ajudado a pH7 (A) e o índice de formação de biofilme formação de biofilme com o SLC ajustado a pH 7 (B).....	35

Figura 10 – Campo aleatório de microscópio, representativo da adesão de: <i>Aliarcobacter butzleri</i> AB28/11(A), <i>Limosilactobacillus reuteri</i> ATCC 23272 (B), <i>Lactobacillus acidophilus</i> LMG 9433 (C) e <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ATCC 8014 (D).....	37
Figura 11 – Capacidade de adesão da estirpe de <i>Aliarcobacter butzleri</i> AB28/11 a células Caco-2 isoladamente ou em competição com as várias estirpes de “lactobacilos”: (A) <i>Limosilactobacillus reuteri</i> ATCC 23272, (B) <i>Lactobacillus acidophilus</i> LMG 9433e (C) <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ATCC 8014 (C).....	40
Figura 12 – Capacidade de Invasão da estirpe de <i>Aliarcobacter butzleri</i> e “Lactobacilos” a células de caco-2 isoladamente e em competição com as várias estirpes de “lactobacilos <i>Limosilactobacillus reuteri</i> ATCC 23272 (A), <i>Lactobacillus acidophilus</i> LMG 9433 (B) e <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ATCC 8014 (C).....	41
Figura 13 – Capacidade de adesão da estirpe de <i>Aliarcobacter butzleri</i> e “lactobacilos” a células de Caco-2 isoladamente e no ensaio de deslocamento com as várias estirpes de “lactobacilos”: <i>Limosilactobacillus reuteri</i> ATCC 23272 (A), <i>Lactobacillus acidophilus</i> LMG 9433 (B) e <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ATCC 8014 (C).....	42
Figura 14 – Capacidade de invasão da estirpe de <i>Aliarcobacter butzleri</i> e “lactobacilos” a células de Caco-2 isoladamente e no ensaio de deslocamento com as várias estirpes de “lactobacilos <i>Limosilactobacillus reuteri</i> ATCC 23272 (A), <i>Lactobacillus acidophilus</i> LMG 9433 (B) e <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ATCC 8014 (C).....	42
Figura 15 – Capacidade de adesão da estirpe de <i>Aliarcobacter butzleri</i> e “lactobacilos” a células de Caco-2 isoladamente e no ensaio de exclusão com as várias estirpes de “lactobacilos”: <i>Limosilactobacillus reuteri</i> ATCC 23272 (A) <i>Lactobacillus acidophilus</i> LMG 9433 (B) e <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ATCC 8014 (C).....	43
Figura 16 – Capacidade de invasão da estirpe de <i>Aliarcobacter butzleri</i> e “lactobacilos” a células de Caco-2 isoladamente e no ensaio de exclusão com as várias estirpes de “lactobacilos”: <i>Limosilactobacillus reuteri</i> ATCC 23272 (A), <i>Lactobacillus acidophilus</i> LMG 9433 (B) <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ATCC 8014 (C).....	44

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Média \pm desvio padrão da DO _{600nm} e UFC/mL de três espécies de “lactobacilos” em três condições de incubação após 16 h de incubação, sendo estes: (i) ambiente de microaerofilia com agitação (100 rpm), (ii) ambiente de microaerofilia sem agitação e (iii) incubação a 5% de CO ₂ em estático.....	23
Tabela 2 – Concentração mínima inibitória de sais biliares para quatro estirpes de <i>Aliarcobacter butzleri</i> e três espécies de “lactobacilos”	28
Tabela 3 – Índice de adesão a linha celular Caco-2 para <i>Aliarcobacter butzleri</i> e três espécies de “lactobacilos” em estudo.....	37

Lista de Acrónimos

BHI	Brain Heart Infusion
Caco-2	Células de adenocarcinoma colorretal humano
CMI	Concentração mínima inibitória
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DO	Densidade ótica
IL-8	Interleucina 8
mCCDA	Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar
MOI	Multiplicidade de infecção (do inglês <i>Multiplicity of infection</i>)
MRS	De Man, Rogosa and Sharpe
MRSA	De Man, Rogosa and Sharpe Agar
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês <i>Phosphate saline buffer</i>)
SLC	Sobrenadante livre de células
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
UFC	Unidades formadoras de colónias

Capítulo 1 - Introdução

As doenças de origem alimentares são um problema de saúde pública que podem estar associadas a uma variedade de fatores como a ingestão de alimentos contaminados biológica ou quimicamente. Nas últimas décadas, este problema tem persistido apesar da evolução significativa das medidas de segurança alimentar (White *et al.*, 2022). Apesar dos avanços no conhecimento científico associado, muitos patógenos ainda não são devidamente estudados como é o caso de *Aliarcobacter butzleri* (Oliveira *et al.*, 2023). Este enteropatógeno, cuja doença associada se apresenta normalmente como autolimitada pode em situações mais severas ser necessário o tratamento com antibióticos. Considerando as elevadas taxas de resistência apresentadas por esta bactéria estas podem apresentar-se como um desafio podendo ser necessárias novas estratégias alternativas para o tratamento destas infeções, como é o caso do uso profilático ou terapêutico de probióticos.

1.1. Género *Aliarcobacter*

1.1.1. História e taxonomia do género *Aliarcobacter*

Uma espécie de *Arcobacter* foi pela primeira vez isolada em 1977 por (Ellis *et al.*, 1977), no entanto, só mais tarde as bactérias pertencentes ao género *Arcobacter* foram incluídas no género *Campylobacter*, sendo conhecidas como campilobactérias aerotolerantes que apresentam a capacidade de crescer em baixas temperaturas (Pérez-Cataluña *et al.*, 2018). O género *Arcobacter* foi proposto por Vandamme e seus colaboradores em 1991, incluindo duas espécies, *Arcobacter nitrofigilis* e *Arcobacter cryaerophilus* (Vandamme *et al.*, 1991). Em 1992, juntaram-se mais duas espécies a este grupo, *Arcobacter butzleri* e *Arcobacter skirrowii*, ambos isolados de fluídos prepuciais de touros ou de fetos abortados de bovinos, suínos e ovinos, e também de fezes diarreicas destes animais (Vandamme, Vancanneyt, *et al.*, 1992). Em 2005, foram adicionadas outras duas espécies a este género, *Arcobacter cibarius* e *Arcobacter halophilus* (Donachie *et al.*, 2005; Houf *et al.*, 2005). Em 2013, com a introdução de *Arcobacter anaerophilus* foi modificado o género, permitindo a inclusão de novas espécies (Sasi Jyothsna *et al.*, 2013). Com isto em 2019, o número de espécies eram 29, mas em 2020 foi atualizado para 33 (Çelik *et al.*, 2022). A mais recente validação taxonómica coloca o género *Arcobacter* como pertencendo à ordem *Campylobacterales* e família *Arcobacteraceae* (Waite *et al.*, 2017). Uma revisão taxonómica por Pérez-Cataluña *et al.*

(2018), reorganizou o género sendo que *Arcobacter butzleri* passou a pertencer ao género *Aliarcobacter* juntamente com *Aliarcobacter cryaerophilus* comb. nov., *Aliarcobacter skirrowii* comb. nov., *Aliarcobacter thereius* comb. nov., *Aliarcobacter trophiarum* comb. nov., *Aliarcobacter lanthieri* comb. nov. e *Aliarcobacter faecis* comb. nov. (Oren & Garrity, 2018; Pérez-Cataluña *et al.*, 2019).

1.1.2. Características gerais de *Aliarcobacter butzleri*

O género *Aliarcobacter* consiste de bactérias Gram-negativo com bacilos curvos com 0,2 a 0,5 µm de diâmetro e 1 a 3 µm de comprimento, as espécies deste género de forma geral movimentam-se através de um único flagelo polar, não produzem pigmentos fluorescentes são quimioorganotróficos, a composição em G+C do DNA é de 26,4% a 29,4% mol, crescem de 15 a 42 °C, em cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) (0,04% p/vol) ou glicina (1% p/vol). Algumas das espécies deste género podem crescer em safranina (0,05% p/vol) ou oxgall (1% p/vol), todas a espécies são oxidase e catalase positivas, não fermentam carboidratos, mas reduzem nitrato a nitrito, hidrolisam o acetato de indoxil, a maioria destas são negativas para urease, algumas espécies são sensíveis à cefoperazona (64 mg/L) (Pérez-Cataluña *et al.*, 2018).

Para além das características gerais relativas ao género *Aliarcobacter*, ao fim de 3 dias de incubação em placas de agar de sangue, as colónias apresentam 2 a 4 mm de diâmetro, sendo a maioria redondas e esbranquiçadas. *A. butzleri* como as outras espécies pertencentes ao género *Aliarcobacter* é catalase fraca e cresce na presença de 8% de glicose, todas as estirpes de *A. butzleri* reduzem nitrato e crescem em meio VB e MacConkey agar, algumas das estirpes conseguem produzir DNase e sulfeto de hidrogénio a partir de cisteína (Chieffi *et al.*, 2020).

1.1.3. Distribuição e vias de transmissão de *Aliarcobacter*

O género *Aliarcobacter* tem vindo a ser estudado como um importante patógeno emergente e um potencial agente zoonótico (Collado & Figueras, 2011). As espécies de *Aliarcobacter* podem ser encontradas numa variedade de reservatórios, como locais de processamento de alimentos, matadouros, águas contaminadas, nos animais, em alimentos, entre outros (Girbau *et al.*, 2017). O consumo de águas e alimentos contaminados tem vindo a ser considerado o principal veículo de transmissão desta bactéria a humanos e animais (Ferreira *et al.*, 2016).

Ao nível da saúde, as espécies mais relevantes dentro deste género são *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii*, *A. lanthieri*, *A. thereius* devido à sua associação a doenças

em animais e humanos (Ferreira *et al.*, 2016; Kerkhof *et al.*, 2021; Pérez-Cataluña *et al.*, 2019). De entre estas, *A. butzleri* é a isolada com mais frequência em humanos, estando maioritariamente associada a enterite com diarreia duradoura e aquosa ou bacteremia (Girbau *et al.*, 2017), e foi classificada pela Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas de Alimentos como patógeno de perigo moderado para humanos (ICMSF, 2018). A taxa real de incidência desta infeção pode estar a ser subestimada devido a identificação incorreta e falta de diagnóstico, sendo mesmo assim considerada a quarta espécie mais frequente em fezes humanas de entre as espécies *Campylobacter-like* (Collado *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2014).

1.1.3.1. Transmissão de *Aliarcobacter* através da água

Como exposto anteriormente, a água é vista como uma das principais fontes de transmissão de *Aliarcobacter* a humanos e animais. Em meio aquático, as espécies de *Aliarcobacter* são maioritariamente encontradas em águas de esgotos e em estações de tratamento de águas residuais e com menor frequência em água do mar, águas subterrâneas, águas provenientes de processamentos de alimentos e em água para consumo (Venâncio *et al.*, 2022).

Por sua vez, a espécie *A. butzleri* é frequentemente encontrada numa grande variedade de meios aquáticos como águas residuais, associado a contaminação por fezes humanas, água do mar, água de lagos, água de rio, água potável, águas subterrâneas ou águas recreativas (Bell *et al.*, 2021; Hsu & Lee, 2015; Venâncio *et al.*, 2022). A capacidade desta de sobreviver e ser encontrada com abundância nas águas residuais pode ser atribuída à capacidade que esta tem de se adaptar a temperaturas baixas e também à capacidade de coexistir com outras espécies bacterianas (Collado & Figueras, 2011). Em água do mar, a espécie *A. butzleri* mostra-se capaz de sobreviver principalmente durante a primavera e verão, ainda que num estado viável mas não cultivável (Collado & Figueras, 2011; Hsu & Lee, 2015). Apesar de perderem a sua capacidade de serem recuperadas em cultura, *A. butzleri* consegue sobreviver. Este estado de sobrevivência demonstra que *A. butzleri* consegue sobreviver em ambientes em que não tem os nutrientes adequados para o seu desenvolvimento (Collado & Figueras, 2011).

A. butzleri pode também ser encontrada em águas potáveis, como a água de nascente e águas de torneira normalmente tratada com cloro (Hsu & Lee, 2015). Apesar de *A. butzleri* ser suscetível ao cloro, os tratamentos das águas podem não ser suficientes para a eliminação desta sendo por isso, necessários métodos para impedir a sua propagação (Ferreira *et al.*, 2016). Todos estes dados vêm demonstrar que a espécie *A. butzleri*

consegue sobreviver em diversas condições aquáticas e pode ser vista como um potencial patógeno de origem aquática.

1.1.3.2. Transmissão de *Aliarcobacter* através de alimentos

A presença de *Aliarcobacter* nos alimentos é outra das principais fontes de contaminação desta espécie. A maior prevalência de *Aliarcobacter* tem sido descrita em carne de aves, seguido pelo marisco (por exemplo, mexilhão e ostras), carne de porco, carne bovina e carne ovina, podendo ser também encontrados em produtos laticínios e vegetais (Mateus *et al.*, 2021). *Aliarcobacter* tem sido isolada bastante frequência em produtos de origem animal, tal como no trato intestinal e amostras fecais de gado saudável, e até em produtos como carne embalada (Ferreira *et al.*, 2016). Uma das possíveis fontes de contaminação da carne poderá ser o estrume utilizado nas práticas agrícolas ou contaminação fecal durante o processamento da carne animal (Ferreira *et al.*, 2019).

A maioria das contaminações alimentares por *A. butzleri* têm sido maioritariamente associadas a falta de higiene no processamento e manuseamento dos alimentos (Chieffi *et al.*, 2020). Por exemplo, *A. butzleri* apresenta a capacidade de sobreviver ao processo de escaldadura (52 °C, 3 min), o que demonstra que existe forte possibilidade de contaminação cruzada durante o processamento em matadouros, e assim a importância da higiene nestes locais. No entanto, acredita-se que uma maneira de diminuir a contaminação por esta bactéria possa ser a refrigeração da carcaça do animal (Ferreira *et al.*, 2016). Para além destes cuidados a ter no processamento da carne, é importante notar que a prevalência de *Aliarcobacter* nos diferentes tipos de animais pode variar dependendo de vários fatores como, a idade do animal, altura do ano e medidas de biossegurança (Shange *et al.*, 2019).

Como *A. butzleri* também pode ser encontrada noutros alimentos para além de carnes, como leite e derivados laticínios, vegetais e marisco (Ferreira *et al.*, 2016). Com isto em mente é importante melhorar as condições de higiene tanto na indústria de processamento de alimentos, como na agropecuária, e até no comércio para travar a disseminação desta bactéria e de outras na cadeia alimentar, melhorando também o controlo da cadeia de refrigeração (Mateus *et al.*, 2021).

1.1.3.3. Transmissão de *Aliarcobacter* através de contacto pessoa-a-pessoa

A contaminação pessoa-a-pessoa foi sugerida quando em Itália numa escola ocorreu um surto de cólicas abdominais. Os dados epidemiológicos demonstraram que todas as estirpes de *A. butzleri* recuperadas das fezes dos pacientes infetados tinham o mesmo

genótipo e fenótipo (Vandamme, Pugina, *et al.*, 1992). Outra possível transmissão de pessoa-a-pessoa foi o caso de um recém-nascido que foi infetado com *A. butzleri*, tendo sido sugerido que a transmissão desta foi feita a partir do útero da mãe infetada (On *et al.*, 1995).

1.1.3.4. Transmissão de *Aliarcobacter* através de contacto com animais

Os animais são vistos como uma via importante na propagação de *A. butzleri*, podendo a disseminação de *A. butzleri* ocorrer através do contacto com as fezes de animais, como bovinos, suínos ou ovinos (Chieffi *et al.*, 2020), ou através de contacto com as fezes ou lambeduras de animais domésticos, como é o caso de cães e gatos. (Ferreira *et al.*, 2016).

O contacto com fezes de animais selvagens como macacos, tartarugas e avestruzes, pode também promover a transmissão da bactéria (Chieffi *et al.*, 2020).

1.2. Patogenicidade e fatores de virulência de *Aliarcobacter butzleri*

A. butzleri é considerado um patógeno humano (Kerkhof *et al.*, 2021; Pérez-Cataluña *et al.*, 2019), sendo associada maioritariamente a diarreia grave, enterite e bacteremia (Simaluiza *et al.*, 2021). No entanto, os mecanismos de patogenicidade e os fatores de virulência desta bactéria ainda precisam de ser mais estudados (Ferreira *et al.*, 2016).

1.2.1. Patogenicidade de *Aliarcobacter butzleri*

Espécies de *Aliarcobacter* demonstram em diferentes estudos capacidade de aderir a células eucariotas e produzir toxinas que danificam as células hospedeiras (Collado & Figueras, 2011; Ferreira *et al.*, 2016). A doença provocada por *A. butzleri* parece resultar da sua adesão à superfície de células epiteliais ou através da invasão destas células, seguida da replicação da bactéria no lúmen intestinal (Çelik *et al.*, 2022).

De facto, os fatores de virulência como a produção de toxinas, adesão, invasividade e penetrabilidade, vêm demonstrar o potencial enteropatogénico desta espécie (Çelik *et al.*, 2022). Por sua vez, outros fatores como a capacidade de formação de biofilmes poderão ter relevância não só para a patogenicidade da bactéria como para a sua sobrevivência, persistência e dispersão (Salazar-Sánchez *et al.*, 2022).

1.2.2. Capacidade da formação de biofilmes

Os biofilmes são grupos de microrganismos organizados dentro de uma matriz de substâncias polimérica extracelular que eles próprios produzem. Os microrganismos encontram-se aderidos entre si numa variedade de superfícies de diferentes origens, tais como implantes médicos, tecidos vivos, canais de água, canos, pisos de hospitais, unidades de processamento de alimentos e outras superfícies bióticas e abióticas (Castiblanco & Sundin, 2016; Gupta *et al.*, 2016; Lohse *et al.*, 2018). Estes biofilmes servem como proteção contra condições adversas encontradas no meio onde estas bactérias se desenvolvem, contribuindo também para a sua resistência a antibióticos (Pang *et al.*, 2019; Rather *et al.*, 2021; Pang *et al.*, 2019; Rather *et al.*, 2021).

Considerando a importância da formação de biofilmes na sobrevivência, persistência e mesmo na virulência de *A. butzleri*, esta característica tem sido estudada em diversas estirpes com origens variadas, sendo considerado forte, moderado ou fraco formador de biofilmes dependendo da estirpe (Ferreira *et al.*, 2013; Martinez-Malaxetxebarria *et al.*, 2022). Esta espécie apresenta a capacidade de formar biofilme em condições de refrigeração, tendo sido já encontrada em canos de água e matadouros (Akier Assanta *et al.*, 2002; Kjeldgaard *et al.*, 2009). Ferreira *et al.* (2013) demonstrou que em isolados provenientes de um matadouro em Portugal, 58,3% das 43 estirpes estudadas mostravam fraca formação de biofilme, 27,8% não demonstravam formação de biofilme, e apenas cinco isolados tinha uma formação moderada de biofilme (Ferreira *et al.*, 2013). Mais recentemente, Chaves *et al.* (2021) demonstrou a capacidade de formação de biofilmes de 38 isolados de *A. butzleri* de diferentes origens, tais como carne de aves, carnes vermelhas e leite, demonstrando que em isolados de carne de aves 67% mostraram formar biofilme, nos isolados de carne vermelha a percentagem foi ligeiramente mais baixa com 62,5%, e nos isolados de leite foram apenas 8% (Chaves *et al.*, 2021).

1.2.3 Capacidade de adesão e invasão a células eucarióticas

Para ocorrer o estabelecimento de uma infeção bacteriana um passo importante é a adesão às células do hospedeiro, esta depois pode ser seguida de uma invasão celular, e potencial multiplicação intracelular, seguida de disseminação ou persistência nos tecidos (Ferreira *et al.*, 2016; Pizarro-Cerdá & Cossart, 2006). Para além disso, para manter e promover uma infeção com sucesso, os patógenos microbianos possuem um conjunto de estratégias para resistir ou escapar à resposta imune inata, causar danos celulares e multiplicar-se (Ferreira *et al.*, 2016). Por sua vez o hospedeiro tem uma variedade de

métodos para resistir a infecções, como ativação de sinais intracelulares que levam a uma resposta inflamatória como resposta à invasão bacteriana. Mas no final é a interação patógeno/hospedeiro que vai definir o desenvolvimento ou ausência do processo patológico (Ferreira *et al.*, 2016).

Estudos *in vitro* tem sido realizados para caracterizar a adesão, invasão e o potencial citotóxico de *A. butzleri* às células hospedeiras, tendo sido a adesão e a citotoxicidade, os efeitos mais observados (Ferreira *et al.*, 2016). De forma geral os resultados são variáveis dependendo da origem da estirpe e as linhagens celulares usadas no estudo. Um exemplo disto foi um ensaio conduzido por Karadas *et al.* (2013), que demonstrou que *A. butzleri* apresentava diferentes capacidades de adesão e invasão consoante as linhas celulares utilizadas, mostrando que em células Caco-2 aderiram todas as estirpes de *A. butzleri*, mas em células HT-29 nem todas foram capazes de aderir (Karadas *et al.*, 2013). Este resultado vem de encontro com o obtido por Levican *et al.* (2013) que demonstrou que das 12 estirpes de *A. butzleri* em estudo todas aderiram e invadiram as células de Caco-2, mas apenas um número bastante reduzido destas estirpes aderiu e invadiu as células HT-29 (Levican *et al.*, 2013). No entanto, quando a bactéria adere e invade um tipo de célula como Caco-2, a tendência de forma geral das estirpes de *A. butzleri* é conseguirem invadir outros tipos de células semelhantes (Houf & Stephan, 2007; Karadas *et al.*, 2013).

Por sua vez, a indução da expressão da citocina pró-inflamatória interleucina 8 (IL-8) foi reportada como um importante fator de virulência em diversas bactérias, incluindo *A. butzleri*, com alguns estudos demonstrando a capacidade de *A. butzleri* induzir a expressão de IL-8 na linha celular de células humanas Caco-2 e em células epiteliais intestinais suínas. No entanto, nenhuma correlação foi encontrada relativamente à adesão e invasão das mesmas linhas celulares (Ho *et al.*, 2007).

Outros estudos têm suportado o potencial patogénico desta bactéria, sendo que o mecanismo pelo qual *A. butzleri* induz diarreia no hospedeiro, foi estudado por Bücken *et al.* (2009), que mostrou que a bactéria é capaz de induzir o comprometimento da barreira epitelial das células humanas de cancro do colon (HT-29/B6), por uma expressão reduzida de proteínas claudina-1,-4 e -8 da junção apertada, aumentando a permeabilidade de macromoléculas pela via paracelular e diminuição da resistência transepitelial (Bücken *et al.*, 2009). Este potencial patogénico tem ainda sido suportado por estudos *in vivo*, com um estudo feito em ratos albinos demonstrando que a concentração de *A. butzleri* tem efeito nos sintomas apresentados no intestino, sendo que menor concentração bacteriana provoca diarreia leve, enquanto que concentrações mais altas levam a uma alteração patológica no intestino (Adesiji, 2010). Por sua vez

outros estudos indicam que *A. butzleri* induz sequelas pro-inflamatórias, menos evidentes em comparação com outras bactérias patogênicas, como *Campylobacter jejuni*, mas apresenta uma maior resposta imunológica no intestino comparando com uma estirpe de *Escherichia coli comensal*, demonstrando que a bactéria será mais do que um comensal (Gölz *et al.*, 2016).

É importante realçar que *A. butzleri* durante a colonização do hospedeiro, para poder aderir e invadir nas células intestinais tem de ultrapassar diversas barreiras do trato gastrointestinal como variações de pH ao longo do percurso, pressão osmótica, e a presença de espécies reativas de oxigênio e bÍlis (Begley *et al.*, 2005; Flint *et al.*, 2016).

1.3. Trato gastrointestinal

O trato gastrointestinal é composto por vários órgãos, estes são a cavidade oral, faringe, esófago, estômago, intestino delgado, intestino grosso, reto, canal anal e ânus (Reed & Wickham, 2009). Quando ingeridos alimentos ou águas contaminadas com patógenos, nomeadamente *A. butzleri*, estes terão de passar pelo trato gastrointestinal para atingirem o intestino com sucesso e estabelecerem infeção, sendo assim é necessário ultrapassar uma variedade de barreiras ao longo do percurso do trato gastrointestinal, tais como as barreiras microbiológica, química, física e imunológica (Fernandez-Cantos *et al.*, 2021). Das várias barreiras que a bactéria patogénica pode encontrar pode destacar-se o pH ácido do estômago, a resistência à bÍlis ou mesmo a microbiota intestinal (Dieterich *et al.*, 2018).

O pH tem uma grande influência na sobrevivência da bactéria, pois esta para colonizar o intestino tem de passar por pH ácido no estômago e sobreviver ao pH presente no intestino (Flint *et al.*, 2016). Esta regulação de pH é conseguida no trato gastrointestinal através da libertação de HCl no estômago e bicarbonato pelo resto do trato gastrointestinal, como por exemplo o intestino (Kohl *et al.*, 2013). Um dos fatores muito importantes para a manutenção do pH é a dieta, dado que esta pode influenciar o pH do trato gastrointestinal, com, por exemplo, alimentos ácidos aumentando o pH do estômago, ou alimentos com alto teor de fibra aumentando a libertação de bicarbonato no intestino (Samuels, 2009). Embora o estômago normalmente tenha um pH de 1 a 2, a camada de muco estabelece um gradiente de pH que aumenta o pH para 6 a 7 na superfície da mucosa (Hunt *et al.*, 2015). O intestino geralmente tem um pH básico de 7,5 a 8 (Begley *et al.*, 2005).

A resistência à bÍlis é outro fator importante para a sobrevivência da bactéria no trato gastrointestinal. A bÍlis é composta por sais biliares, fosfolipídios, esteróis e pigmentos biliares (Holm *et al.*, 2013), onde os sais biliares (Begley *et al.*, 2005) desempenham papéis cruciais durante a digestão e na absorção de compostos lipofílicos, podendo também melhorar a digestão das proteínas da dieta devido à sua natureza detergente e efeito na desnaturação de proteínas (Holm *et al.*, 2013). Os sais biliares afetam ainda a adesão celular, a adesão intestinal e a formação de biofilme, nomeadamente em *A. butzleri*, sendo estes importantes para a sobrevivência e patogenicidade das bactérias (Mateus *et al.*, 2023).

A microbiota é mais uma das importantes barreiras que as bactérias têm de ultrapassar, sendo que a microbiota intestinal tem várias funções importantes, destacando-se para este trabalho a inibição da adesão de agentes patógenos a superfícies intestinais (Sánchez *et al.*, 2017).

A composição da microbiota é bastante discutida, pois não existe uma resposta definitiva quanto à sua composição devido à variabilidade que pode apresentar de indivíduo para indivíduo, associada a diferenças alimentares, ambientais, entre outros fatores (Costello *et al.*, 2009). De entre a variada composição da microbiota intestinal podemos encontrar agentes considerados probióticos que ao longo dos tempos têm vindo a ser consumidos pelas suas propriedades. O principal objetivo do consumo de probióticos é ter um efeito positivo na saúde do hospedeiro, podendo ser concretizado de diferentes maneiras como, interferindo com potenciais patógenos, melhorando a função de barreira no intestino, pela modulação de respostas imunológicas, melhoria do estado nutricional do hospedeiro ou modulando a microbiota, entre outras (Sánchez *et al.*, 2017).

1.4. Probióticos

O termo probiótico surgiu há muito tempo, e desde aí veio a desenvolver-se na definição que hoje conhecemos, como microrganismo que confere benefícios para a saúde quando consumido em quantidades adequadas (Kim *et al.*, 2019; Suez *et al.*, 2019). Esta definição foi sugerida em 2002 pela Organização Mundial de Saúde juntamente com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO & WHO., 2006; Kim *et al.*, 2019; Suez *et al.*, 2019; Wilkins *et al.*, 2017). Nos dias de hoje, os probióticos são o suplemento alimentar mais consumido em todo o mundo, presentes em diversos alimentos usualmente consumidos no dia a dia, desde iogurtes, queijos, gelados, cereais,

variados snacks ou em fórmulas infantis (Suez *et al.*, 2019). Para além da alimentação, também podem ser encontrados em produtos cosméticos, sendo ainda encontrados no mercado farmacêutico suplementos de probióticos e comprimidos liofilizados (Suez *et al.*, 2019). Os probióticos têm vindo a ser estudados cada vez mais e têm demonstrado modular eficazmente o sistema gastrointestinal podendo levar a uma melhoria na saúde do indivíduo (Piccioni *et al.*, 2021).

Um das maiores questões relativamente aos probióticos é a sua capacidade de colonizar de forma estável ou mesmo transitória a superfície da mucosa gastrointestinal do hospedeiro. Outra questão importante que não está resolvida é se esta colonização é necessária para que estes probióticos tenham impacto benéfico no hospedeiro (Suez *et al.*, 2019). Esta proximidade à camada epitelial intestinal pode ser muito importante, pois poderá permitir interações hospedeiro-microrganismo, tais como modulação imune dependente de contacto, secreção de metabolitos e modificação da camada mucosa, para além de funcionar como barreira para a colonização de bactérias patogénicas (Atarashi *et al.*, 2015; Thaiss *et al.*, 2016).

A maior parte das alegações acerca da colonização dos probióticos surgem da avaliação da abundância de espécies probióticas nas fezes, sem qualquer tipo de testes para averiguar se realmente reflete a capacidade destes de colonizarem ou até passar no trato gastrointestinal (Suez *et al.*, 2019). As bactérias probióticas podem ser encontradas em vários locais do corpo humano, nomeadamente nos órgãos do trato gastrointestinal, podendo ser derivado da presença natural destas ou da ingestão de suplementos (Sánchez *et al.*, 2017).

Os efeitos de probióticos que não são dependentes de colonização, também necessitam ser estudados principalmente no impacto da digestão de alimentos, com isso em mente existem estudos que indicam que o consumo ativo de probióticos pode levar a um importante reservatório de bactérias intestinais (Suez *et al.*, 2019).

Outro fator que ainda não está bem estudado é se após o término do consumo do suplemento, os probióticos permanecem a colonizar no intestino e a oferecer os benefícios do mesmo. Alguns estudos demonstram que tal não acontece, em modelos *in vivo* de rato verificou-se que após o fim do consumo do suplemento de probióticos, o seu efeito apenas durava mais uns dias. Em humanos, a conclusão foi similar, ao fim do período de consumo do suplemento probiótico, os indivíduos deixaram de apresentar probióticos nas fezes após alguns dias a semanas, o que levou a sugerir que os probióticos

não conseguem manter a colonização prolongada ao fim do consumo dos suplementos probióticos (Suez *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2016).

A maioria das estirpes de probióticos são considerados como geralmente seguros para consumo pelas autoridades reguladoras apesar de algumas dúvidas quanto à sua eficácia (Compare *et al.*, 2022; Suez *et al.*, 2019; Williams, 2010). A segurança destes advém do histórico de probióticos nos alimentos que aparenta ser de uso seguro e de os testes clínicos efetuados serem maioritariamente focados na eficácia destes e não na sua segurança. Apesar de o consumo destes por adultos saudáveis ser aparentemente seguro, este pode apresentar riscos de infeção e morbidade em recém-nascidos e crianças com baixos pesos ao nascimento, tal como em adultos e crianças com doenças ou gravemente feridas em unidades de cuidados intensivos, em pacientes pós-operatórios, hospitalizados e imunocomprometidos (Suez *et al.*, 2019; Williams, 2010).

Muitos microrganismos têm vindo a ser estudados e usados como probióticos, entre estes estão *Lactobacillus sp.*, *Bifidobacterium sp.*, *Enterococcus sp.*, *E. coli*, *Propionibacterium sp.*, *Leuconostoc*, *Lactococcus sp.*, *Pediococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Saccharomyces cerevisiae sp.* e *Saccharomyces boulardii sp.* (O’Callaghan & O’Toole, 2013; Valeriano *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018).

1.5. “Lactobacilos”

1.5.1. História e Taxonomia

Em 1901 foi proposto por Beijerinck, o género *Lactobacillus* que incluía bactérias de Gram-positivo, fermentadoras, anaeróbicas facultativas e não formadores de esporos (Zheng *et al.*, 2020). Estes foram classificados como pertencendo à classe *Bacilli*, ordem *Lactobacillales*, família *Lactobacillaceae*, que por sua vez continha os géneros *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* e *Pediococcus*. Em 2020, existiam 261 espécies de *Lactobacillus*, altura em que foi feita uma reestruturação da taxonomia destes, com o objetivo de melhorar a uniformidade dos géneros. Assim, foi proposta uma reclassificação do género *Lactobacillus* em 25 géneros, incluindo o género emendado *Lactobacillus*. Da mesma forma, a família *Lactobacillaceae* passou a incluir todos os géneros previamente incluídos nas famílias *Lactobacillaceae* e *Leuconostocaceae*. O termo genérico “lactobacilos” será usado para designar todos os organismos classificados como pertencendo à família *Lactobacillaceae* até 2020 (Zheng *et al.*, 2020). Para este

trabalho, as modificações na taxonomia que são relevantes foram a alteração de *Lactobacillus plantarum* para *Lactiplantibacillus plantarum*, e de *Lactobacillus reuteri* que passou a denominar-se *Limosilactobacillus reuteri*; no caso de *Lactobacillus acidophilus*, este não sofreu qualquer alteração (Zheng *et al.*, 2020).

1.5.2 Características gerais dos “lactobacilos”

Os “lactobacilos” são geralmente encontrados em produtos lácteos, vegetais fermentados e produtos à base de carne e, como tal, são consumidos como parte da dieta normal. Para além de serem encontrados nestes alimentos são um componente importante da microbiota de humanos e outros mamíferos, estando presentes no trato respiratório, trato gastrointestinal e trato genital (Heeney *et al.*, 2018; Scillato *et al.*, 2021). (Lebeer *et al.*, 2008b). Ainda podem ser encontrados em esgotos e em material vegetal em decomposição (Lebeer *et al.*, 2008; O’Callaghan & O’Toole, 2013).

No trato gastrointestinal, apesar de em menor quantidade que na vagina, estes podem ser isolados de praticamente todos os locais desde a cavidade oral até o reto, apesar de na cavidade oral e no intestino delgado apresentarem baixa concentração celular (Tannock, 2002; Valeriano *et al.*, 2017). Um equívoco comum é considerar-se que os “lactobacilos” são bactérias dominantes no intestino ou são espécie abundante na microbiota intestinal (O’Callaghan & O’Toole, 2013).

A presença de “lactobacilos” em diferentes locais, leva a que estes tenham diferentes evoluções dependendo do local de crescimento, mostrando a sua capacidade de se adaptarem às variadas condições de crescimento (Lebeer *et al.*, 2008).

Os “lactobacilos” fermentam carboidratos para produzir ácido láctico. As espécies homofermentativas não possuem a enzima fosfoctolase necessária para a fermentação das pentoses, enquanto as estirpes fermentativas obrigatórias possuem esta enzima e também podem produzir uma aldolase que lhes permite utilizar o gluconato. Estirpes e espécies com origem no intestino em geral têm a capacidade de utilizar uma gama mais ampla de carboidratos, dentre estes o principal serão os oligossacarídeos que são libertados durante a digestão de amido e celulose no intestino de mamíferos (O’Callaghan & O’Toole, 2013).

1.5.3. “Lactobacilos” como probióticos

Ao longo dos tempos, diferentes espécies e estirpes da família *Lactobacillaceae* têm apresentado características interessantes que os levam a ser usados como probióticos (Valeriano *et al.*, 2017).

Os “lactobacilos” têm uma variedade de interações conhecidas ou propostas, sendo que está descrito que para além de efeitos anti-inflamatórios, melhoram a função de barreira ao remodelar junções apertadas, ou interagem ou regulam a atividade de células epiteliais, macrófagos, células dendríticas e células T reguladoras (O’Callaghan & O’Toole, 2013; Yang *et al.*, 2018). As amplas consequências dessas interações com o tecido linfóide associado ao intestino equivalem a influências moduladoras potencialmente profundas na resposta imunitária, para as quais existem vários níveis em humanos. Isto prova que este grupo de microrganismos ainda tem muito potencial para ser explorado (O’Callaghan & O’Toole, 2013).

Lactiplantibacillus plantarum é um lactobacilo fermentativo, fermentando hexoses e pentoses para produzir ácido láctico, CO₂ e etanol ou acetato. É comum ser usado na produção e fermentação de laticínios, carnes e vegetais (Liu *et al.*, 2018). Apesar de ter a capacidade de sobreviver às barreiras encontradas ao longo do trato gastrointestinal e aderir as células epiteliais, sendo considerado uma espécie segura em animais e humanos (Behera *et al.*, 2018), *L. plantarum* tem dificuldades em manter uma população estável no trato gastrointestinal (Liu *et al.*, 2018). O potencial como probiótico de *L. plantarum* está já bastante descrito e vai de acordo com o acima descrito anteriormente para os “lactobacilos” em geral (Behera *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2018; Seddik *et al.*, 2017).

Limosilactobacillus reuteri é um lactobacilo heterofermentativo, que cresce em zonas com oxigénio limitado, é encontrado no trato gastrointestinal de animais e humanos (Mu *et al.*, 2018). Esta bactéria tem a capacidade de aderir às células epiteliais, e produzir proteínas que se ligam ao muco dificultando a ação de organismos patogénicos sobre estas (Saviano *et al.*, 2021). Assim, diversos estudos têm demonstrado o potencial probiótico desta espécie, como é o caso de estimular o funcionamento da mucosa como barreira ou produzir compostos antimicrobianos como reuterina e ácido láctico (Mu *et al.*, 2018; Saviano *et al.*, 2021).

Lactobacillus acidophilus é um organismo homofermentativo, que utiliza a glicólise ou via Embden–Meyerhof–Parnas para fermentar hexoses e produzir ácidos D e L-lácticos (Anjum *et al.*, 2014). É encontrado no trato gastrointestinal e boca de animais e humanos

(Goldstein *et al.*, 2015). *L. acidophilus* tem sido extensivamente estudado, pois este tem características que o tornam um potencial probiótico, estas características na sua maioria são compartilhadas com outras espécies como ajudar a modular a microbiota do trato gastrointestinal, tolerância a baixo pH, resistência biliar, adesão a células do cólon humano em cultura celular, produção de antibióticos e atividade de lactase (Anjum *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2022; Goldstein *et al.*, 2015).

Capítulo 2 - Objetivos

Aliarcobacter butzleri é uma bactéria patogénica de Gram-negativo, que tem vindo a ser descrita como amplamente distribuída em diversos ambientes e hospedeiros, sendo classificada pelo Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos como uma bactéria de risco moderado para a saúde humana. Esta bactéria está associada a doenças como diarreia grave, enterite e bacteremia. Sendo considerada uma bactéria enteropatogénica, deve atravessar o trato gastrointestinal para atingir o local de colonização, encontrando no percurso diversas barreiras como o pH, os sais biliares, e microbiota, incluindo os probióticos. Os probióticos são considerados bactérias benéficas e que podem ter o potencial de afetar a virulência das bactérias patogénicas. Com isto em mente, o objetivo deste trabalho foi estudar o efeito de probióticos, nomeadamente das espécies *Lactiplantibacillus plantarum*, *Limosilactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus*, na sobrevivência e virulência de *A. butzleri*.

Para tal foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar o efeito do sobrenadante dos probióticos no crescimento de *A. butzleri*;
- Avaliar a tolerância de probióticos e *A. butzleri* a condições gastrointestinais, como o pH e sais biliares;
- Analisar o crescimento de *A. butzleri* quando na presença de estirpes probióticas;
- Estudar o efeito dos sobrenadantes na formação de biofilmes de *A. butzleri*;
- Estudar o efeito de probióticos na virulência de *A. butzleri*, nomeadamente na competição, deslocamento e exclusão na adesão e invasão celular;

Capítulo 3 - Materiais e métodos

3.1. Estirpes bacterianas usadas no estudo

Neste estudo foram usadas quatro estirpes de *A. butzleri* e três espécies de “lactobacilos” para avaliar os efeitos dos probióticos na virulência de *A. butzleri*. As estirpes de *A. butzleri* incluíram duas estirpes de origem alimentar, a estirpe DQ40A1 e a estirpe AB28/11, e duas estirpes de origem humana, as estirpes INSA 2999 e INSA 2756. Relativamente às espécies de “lactobacilos” foram utilizadas as estirpes *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 8014, *Limosilactobacillus reuteri* ATCC 23272 e *Lactobacillus acidophilus* LMG 9433.

3.2. Condições de armazenamento e crescimento das estirpes

Todas as estirpes foram preservadas em tubos criogênicos em meio Brain Heart Infusion (BHI) com 20% (v/v) de glicerol a uma temperatura de -80 °C. Para posterior utilização as estirpes de *A. butzleri* foram inoculadas em placas de Tryptic Soy Agar (TSA) a 37 °C em ambiente de microaerofilia, e as estirpes de “lactobacilos” em meio De Man, Rogosa and Sharpe Agar (MRSA), a 37 °C e em microaerofilia durante 48 horas. A microaerofilia foi gerada através do sistema Anoxomat AN2CTS (Mart Microbiology B.V., Alemanha), criando uma atmosfera com 6% de O₂, ± 7,1% de CO₂ e 3,6% de H₂. Após incubação, as placas inoculadas foram guardadas a 4 °C até utilização, por um período máximo de duas semanas. Para utilização nos ensaios todas as estirpes foram repicadas nos meios adequados durante 24 h e usadas para cultura *overnight* (~16 h) a 37 °C em microaerofilia a 100 rpm, em meio Tryptic Soy Broth (TSB) para as estirpes de *A. butzleri* e De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) para as estirpes de “lactobacilos”.

3.3. Avaliação do crescimento de lactobacilos

Neste ensaio foram testadas diferentes condições de crescimento para as estirpes de “lactobacilos”, para avaliar as condições associadas a um melhor crescimento, mas também de propriedades probióticas. Assim, após crescimento em meio sólido foram realizadas culturas *overnight* sob diferentes condições de crescimento: (i) ambiente de microaerofilia com agitação (100 rpm), (ii) ambiente de microaerofilia em estático e (iii) incubação a 5% de CO₂ em estático. O efeito das condições ambientais foi avaliado no

crescimento das bactérias por avaliação do crescimento dos “lactobacilos” ao fim de 16 h de cultura nas diferentes condições, fazendo a leitura da densidade ótica a 600 nm (DO_{600nm}), e contagem de células viáveis. A contagem de células viáveis foi feita por determinação das unidades formadoras de colônias (UFC)/mL, fazendo diluições decimais sucessivas das amostras em NaCl 0.85% (p/vol) estéril, seguido da aplicação pelo método *drop plate* em placa de MRSA, e incubação por 48 h a 37 °C em condições de microaerofilia gerada através do sistema Anoxomat. Este ensaio foi realizado pelo menos três vezes independentemente para cada estirpe. A monitorização de propriedades probióticas foi realizada através do método de difusão em poço de acordo com o descrito na subsecção 3.6.

3.4. Avaliação de sobrevivência a ambientes acídicos

A avaliação de sobrevivência a ambientes acídicos foi feita como descrito por Isohanni *et al.*, (2013) com ligeiras alterações. Assim, as estirpes de *A. butzleri* e “lactobacilos” em estudo foram cultivadas como descrito anteriormente, sendo que as células após cultura *overnight* foram centrifugadas a 12300 ×g e depois ressuspensas em meio TSB para *A. butzleri* e meio MRS para os probióticos em estudo, ajustando a uma concentração celular de aproximadamente 10^8 UFC/mL. De seguida foram adicionados 300 µL da suspensão celular a 2700 µL do respetivo meio de crescimento ajustado aos pH 4; 3,5; 3 e 2,5 por adição de ácido clorídrico 1 M, e as culturas incubadas a 37 °C. Contagens viáveis de *A. butzleri* e dos probióticos foram determinadas a 0, 20, 40, 60 e 120 minutos de exposição ao stress ácido por diluições sucessivas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril, pH 7,4 (10 mmol/L) seguido de aplicação pelo método *drop plate* em TSA para *A. butzleri* ou MRSA para as estirpes probióticas, e incubação por 48 h a 37 °C em condições de microaerofilia. Este ensaio foi realizado pelo menos três vezes independentemente para cada estirpe.

3.5. Avaliação da suscetibilidade a sais biliares

Neste ensaio o perfil de suscetibilidade a sais biliares das estirpes em estudo foi avaliado através da realização de ensaios de determinação de concentração mínima inibitória (CMI), pelo método de diluição em agar. Assim, foram preparadas placas de TSA para estirpes de *A. butzleri* e placas de MRSA para estirpes de “lactobacilos” com diversas concentrações de sais biliares (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) consistindo aproximadamente de uma mistura 1:1 de colato de sódio e desoxicolato de sódio, numa gama de 20% a 0,125% (m/vol).

Para todas as estirpes em estudo, foi normalizada a densidade do inóculo suspendendo as colônias partindo de cultura em meio sólido como descrito na seção 3.2., numa solução salina de 0,85% (m/vol) de NaCl e ajustada a 0,5 unidades de MacFarland. De seguida foi preparada uma diluição de 1:10 em solução salina e foram inoculados 2 µL na superfície de cada placa de meio previamente preparada com concentrações diferentes de sais biliares. Estas placas foram depois incubadas a 37 °C em microaerofilia durante 48 h. Para controlo de crescimento, as estirpes foram inoculadas em meio TSA para *A. butzleri* e em meio MRSA para os probióticos, sem a adição de sais biliares. A CMI foi determinada assumindo a concentração da primeira placa que não apresentava crescimento a olho nu. Este ensaio foi realizado pelo menos três vezes de forma independente.

3.6. Difusão em poço e avaliação de crescimento de *Aliarcobacter butzleri* nos sobrenadantes livres de células de “lactobacilos”

Neste ensaio, o efeito do sobrenadante livre de células (SLC) no crescimento de *A. butzleri* foi avaliado pelo método de difusão em poço e por avaliação do crescimento na presença de SLC. Assim, para o ensaio de difusão em poço começou por se preparar placas com 20 mL de TSA, perfurando depois o agar com uma pipeta de vidro, dando origem a poços com um diâmetro de aproximadamente 6 mm. De seguida, as suspensões celulares de *A. butzleri*, preparadas como descrito no ponto 3.5, foram inoculadas nas placas usando uma zaragatoa. Os SLC utilizados neste ensaio foram preparados de acordo com as condições otimizadas no ponto 3.3, obtidas por separação das células do sobrenadante por centrifugação a 8000 ×g durante 5 min, seguido de filtração através de filtro de poro de 0,2 µm. Os sobrenadantes foram mantidos a -20 °C até utilização. 50 µL de cada SLC foi adicionado em cada poço das placas previamente preparadas e inoculadas. Ao fim de 48 h foram medidos os halos de inibição de crescimento.

Para aprofundar a avaliação do efeito do SLC sobre *A. butzleri*, a estirpe *A. butzleri* AB28/11 foi previamente cultivada como descrito na secção 3.2. Uma placa de 96 poços de poliestireno foi preparada, colocando nos primeiros dois poços de cada coluna 50 µL de SLC, e do segundo poço até ao último foram colocados 50 µL de meio TSB, e foram feitas diluições sucessivas de 1:2. De seguida, 50 µL da suspensão de *A. butzleri* com concentração de 10⁸ UFC/mL foi colocado nos poços.

Por forma a avaliar a natureza da atividade antimicrobiana do SLC, os sobrenadantes foram submetidos a várias condições, estas sendo, o tratamento do SLC a temperatura

de 100 °C durante 30 minutos, e ajuste do pH dos SLC a 5,5 e 7,0 com NaOH. Como controlo usou-se o ensaio onde foi adicionado TSB no lugar da suspensão bacteriana. Depois de preparadas as placas, estas foram incubadas durante 48 h a 37 °C em microaerofilia. A leitura destas placas foi feita no leitor de microplacas (Biorad, xMark) a 620 nm. O valor de DO_{620nm} provém da média do valor do ensaio subtraindo o controlo para cada condição. Estes ensaios foram realizados em duplicado e pelo menos três vezes independentemente de cada estirpe.

3.7. Cocultura de *Aliarcobacter butzleri* com cada um dos probióticos em estudo

As coculturas foram realizadas com as estirpes de “lactobacilos” anteriormente descritas e com uma estirpe de *A. butzleri* AB28/11, provenientes de culturas *overnight* preparadas como previamente descritas na seção 3.2.

Os meios utilizados para os ensaios de cocultura foram TSB, MRS ou uma mistura de 1:1 de TSB e MRS. Em cada condição foi colocado um tubo de ensaio com a estirpe de *A. butzleri*, um tubo com a estirpe de “lactobacilos” e ainda outro tubo com ambas as estirpes em cocultura, nas mesmas concentrações celulares. Assim, em cada tubo foi usado um volume total de 3 mL, colocando 2700 µL do respetivo meio de crescimento e 300 µL de suspensão bacteriana previamente preparada a uma concentração de 10^8 UFC/mL ou 2400 µL do respetivo meio com 300 µL de cada estirpe, quando feita cocultura com estirpe AB28/11 e estirpes de “lactobacilos” em estudo. Contagens de células viáveis de *A. butzleri* e “lactobacilos” foram realizadas às 0, 24 e às 48 h por diluições sucessivas em PBS estéril, seguido do método *drop plate* em placas de Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar (mCCDA), sendo este um meio seletivo para *A. butzleri*, e placas de MRSA, sendo este meio seletivo para as estirpes probióticas. As placas foram colocadas durante 48 h em incubação a 37 °C em condições de microaerofilia. Este ensaio foi realizado pelo menos três vezes independentemente para cada estirpe.

3.8. Avaliação do efeito do SLC na formação de biofilmes

A estirpe *A. butzleri* AB28/11 foi previamente cultivada conforme descrito anteriormente na seção 3.2. A partir da cultura *overnight* foi então preparada uma suspensão celular ajustada a uma DO_{620nm} de 0,2, que equivale a aproximadamente 10^8 UFC/mL em TSB. De seguida, foi colocado 500 µL da suspensão celular numa placa de 24 poços de poliestireno e 500 µL de cada SLC. O ensaio foi feito com SLC e SLC com o pH ajustado

a 7. Como controlo negativo foram adicionados 1 mL de TSB ou TSB com MRS 1:1 (v/v), o controlo de formação de biofilme foi feito fazendo a suspensão celular nos meios de cultura indicados. A incubação da placa foi feita em microaerofilia durante 48 h a 37 °C. Ao fim das 48 h procedeu-se à leitura da DO_{620nm} , seguida da revelação do biofilme, assim primeiramente foi removido o meio de cada poço e incubando a placa a 55 °C durante 1 h. Após a hora de incubação, o biofilme foi corado com 1 mL de violeta de cristal a 0,1% (m/v) em água desionizada e incubado à temperatura ambiente por 15 min. De seguida, os poços foram lavados três vezes com água destilada e secos a 55 °C durante 15 min. O violeta de cristal ligado foi solubilizado com 1 mL de solução contendo 30% de metanol e 10% de ácido acético. Por último, de forma a quantificar a formação de biofilme, foi efetuada a leitura da absorvância das amostras a 570 nm, com recurso a um leitor de microplacas (Biorad, xMark). Para além disso foi calculado o índice de formação de biofilme (IFB) com a equação:

$$IFB = \frac{Abs_{570nm}(ensaio) - Abs_{570nm}(controlo\ negativo)}{DO_{620nm}(ensaio) - DO_{620nm}(Controlo\ negativo)}.$$

Cada ensaio foi executado com oito replicados em três ensaios independentes.

3.9 Avaliação da adesão de *Aliarcobacter butzleri* e estirpes de “lactobacilos” à linha celular Caco-2

Neste ensaio foi utilizada uma linha celular imortalizada de células de adenocarcinoma colorretal humano (Caco-2). Estas células foram cultivadas em frascos de cultura com meio Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) *high glucose* a pH 7,2 suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 1% (v/v) de aminoácidos não essenciais, 100 µg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina, a 37 °C em 5% CO₂ e com mudança de meio de dois em dois dias até ser atingida a confluência de aproximadamente 80%. Antes da realização do ensaio, as células foram tripsinizadas e procedeu-se à contagem das células viáveis. De seguida, as células foram semeadas a uma concentração de 1,4 x 10⁵ células por poço em lamelas revestidas com poli-D-lisina, colocadas em placas de poliestireno de 24 poços e incubadas durante 3 dias a 37 °C em 5% CO₂. As estirpes de *A. butzleri* e probióticos foram cultivadas como descrito anteriormente na seção 3.2. Assim, as culturas *overnight* foram recolhidas e centrifugadas a 12300 ×g durante 5 min, lavadas e ressuspensas em meio DMEM suplementado, mas sem antibiótico, e pré-aquecido a 37 °C. Para confirmar a densidade celular de cada uma das suspensões preparadas foram realizadas diluições sucessivas decimais, que foram inoculadas em placas de meio mCCDA para a estirpe de *A. butzleri* e MRSA para as estirpes probióticas, para posterior

contagem. As células Caco-2 foram lavadas com 500 µL de PBS duas vezes, sendo de seguida adicionados 500 µL de cada uma das suspensões bacterianas, quer de *A. butzleri* ou das estirpes de “lactobacilos” em estudo, ajustadas a 10⁸ UFC por poço correspondendo a uma multiplicidade de infeção (MOI) de aproximadamente 100. De seguida a placa foi incubada durante duas horas nas condições acima referidas, para que fosse permitida a ocorrência de adesão. Ao fim das duas horas as células foram lavadas duas vezes com 500 µL de PBS. De seguida as células foram fixadas com 200 µL de metanol durante 30 minutos. As lamelas foram coradas utilizando a técnica de Gram. As bactérias aderidas e as células de Caco-2 foram contadas em 20 campos ao microscópio para avaliar o índice de adesão(Wang et al., 2014).

3.10. Avaliação da competição, deslocamento e exclusão de *Aliarcobacter butzleri* com as estirpes de “lactobacilos” na adesão e invasão à linha celular Caco-2

Neste ensaio as células Caco-2 foram cultivadas como descrito acima, com a exceção de que neste caso, as células foram cultivadas diretamente nas placas de 24 poços, não sendo usadas lamelas no fundo dos poços. As estirpes de *A. butzleri* e “lactobacilos” foram também preparadas como descrito na seção 3.9.

Assim, para avaliação da competição entre *A. butzleri* e “lactobacilos”, as células Caco-2 foram lavadas com 500 µL de PBS duas vezes, sendo de seguida adicionados 500 µL de cada uma das suspensões bacterianas, quer de *A. butzleri* ou das estirpes de “lactobacilos” em estudo, ajustadas a 10⁸ UFC por poço correspondendo a uma multiplicidade de infeção (MOI) de aproximadamente 100. Nos ensaios de avaliação de competição entre *A. butzleri* e cada uma das estirpes de probióticos foi adicionado 250 µL de cada suspensão no dobro da concentração do ensaio com cada estirpe individualmente. De seguida a placa foi incubada durante duas horas nas condições acima referidas, para que fosse permitida a ocorrência de adesão e invasão.

Depois de passadas as duas horas, as células foram lavadas 3 vezes com 500 µL de PBS estéril de modo a remover as bactérias que não aderiram, tendo o número de bactérias que interagiram (aderentes e internalizadas) sido determinado através da lise das células Caco-2 com 500 µL de Triton X-100 a 0,1% (v/v), seguida da realização de diluições sucessivas decimais e contagem em placas com meio mCCDA ou MRSA dependendo da espécie a analisar.

Na avaliação da invasão bacteriana, depois das 2 h de incubação e das etapas de lavagem acima indicadas foram adicionados 500 µL do meio usado para as células Caco-2 contendo 125 µg/mL de gentamicina a cada poço da placa de 24 poços, seguindo-se uma

hora de incubação de forma a matar as bactérias extracelulares. Após incubação, as células foram lisadas pela adição de 500 µL de Triton X-100 a 0,1% (v/v) e o número de bactérias intracelulares libertadas foi determinado através da realização de diluições sucessivas decimais e contagem em placas de meio mCCDA e/ou MRSA por incubação em condições de microaerofilia a 37 °C durante 48 h. Para a avaliação de deslocamento de *A. butzleri* induzido pelos “lactobacilos” em estudo, as células Caco-2 foram lavadas com 500 µL de PBS duas vezes, sendo de seguida adicionados 500 µL da suspensão bacteriana de *A. butzleri*, ajustada a 10⁸ UFC por poço. De seguida, a placa foi incubada durante 2 h nas condições acima referidas. Depois de passadas as duas horas, as células foram lavadas 3 vezes com 500 µL de PBS e foi adicionado 500 µL da suspensão bacteriana de “lactobacilos” ajustada a 10⁸ UFC por poço e incubada durante 1 h nas condições acima referidas. Após incubação, as células foram lavadas como referido acima no ensaio de competição, e a avaliação da adesão e invasão foi realizada como descrita acima. Para a avaliação de exclusão de *A. butzleri* pelos “lactobacilos” em estudo, as células Caco-2 foram lavadas com 500 µL de PBS 2 vezes, sendo de seguida adicionados 500 µL suspensão bacteriana de “lactobacilos” ajustada a 10⁸ UFC por poço e incubada durante 1 h nas condições acima referidas. Após incubação, as células foram lavadas 3 vezes com 500 µL de PBS e foi adicionado 500 µL da suspensão bacteriana de *A. butzleri*, ajustada a 10⁸ UFC por poço e a placa foi incubada durante mais 2 h nas condições acima referidas. A adesão e invasão foi avaliada como descrito anteriormente. Todos os ensaios foram realizados em triplicado, pelo menos 3 vezes de forma independente (Campana et al., 2012).

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

A. butzleri é apresentado como um enteropatógeno emergente, sendo classificado pela Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas de Alimentos como um patógeno de perigo moderado para humanos. Estando associada a doenças gastrointestinais, é necessário que esta ultrapasse diversas barreiras para atingir o seu alvo no hospedeiro, nomeadamente a microbiota intestinal onde estão incluídos os probióticos. Assim, este trabalho teve como objetivo o estudo do efeito que os probióticos têm na virulência de *A. butzleri*, como uma potencial alternativa para o seu controlo.

4.1. Seleção das condições do crescimento das estirpes de “lactobacilos” em estudo

A otimização do crescimento dos “lactobacilos” é um processo importante para o desenvolvimento dos restantes ensaios realizados neste trabalho, com isso em mente foi avaliado o crescimento das estirpes de “lactobacilos” em diferentes condições de incubação.

Analisando a Tabela 1 pode-se verificar que as três estirpes de “lactobacilos” apresentam crescimento médio aproximado nos três ambientes estudados, no entanto apesar de alguma variabilidade associada verificou-se uma DO ligeiramente superior em microaerofilia com agitação.

Tabela 1 – Média \pm desvio padrão da DO_{600nm} e UFC/mL de três espécies de “lactobacilos” considerando três condições de incubação.

Estirpes	Microaerofilia com agitação		Microaerofilia sem agitação		5% de CO ₂ em estático	
	DO _{600nm}	UFC/mL	DO _{600nm}	UFC/mL	DO _{600nm}	UFC/mL
<i>Limosilactobacillus reuteri</i> ATCC 23272	7,36 \pm 0,99	3,01 \pm 1,23 $\times 10^7$	5,70 \pm 2,14	2,15 \pm 5,20 $\times 10^7$	5,44 \pm 2,60	1,94 \pm 5,33 $\times 10^7$
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LMG 9433	7,34 \pm 2,35	2,80 \pm 1,91 $\times 10^7$	6,72 \pm 0,97	3,15 \pm 1,45 $\times 10^7$	5,82 \pm 1,26	2,02 \pm 8,83 $\times 10^7$
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ATCC 8014	7,66 \pm 1,03	3,37 \pm 2,59 $\times 10^7$	6,10 \pm 0,80	3,19 \pm 1,98 $\times 10^7$	6,60 \pm 0,46	2,35 \pm 6,87 $\times 10^7$

Numa fase inicial, e considerando que as condições de cultura testadas não influenciaram de forma significativa o crescimento e viabilidade das bactérias, neste estudo ainda se considerou a potencial produção de produtos antimicrobianos pelos “lactobacilos” na seleção das condições de crescimento dos “lactobacilos” a usar. De facto, é conhecido que os sobrenadantes de culturas de “lactobacilos”, nomeadamente *L. acidophilus*, *L. reuteri* e *L. plantarum*, contêm uma variedade de compostos que podem ter atividade antimicrobiana, tais como ácido láctico, peróxido de hidrogénio (H₂O₂), bacteriocinas e biosurfactantes (Scillato *et al.*, 2021). Assim, a suscetibilidade das estirpes de *A. butzleri* na presença de SLC produzidos pelos “lactobacilos” em estudo foi avaliada usando a metodologia de difusão em poço, um ensaio bastante utilizado para avaliar a suscetibilidade das bactérias a vários compostos (Balouiri *et al.*, 2016).

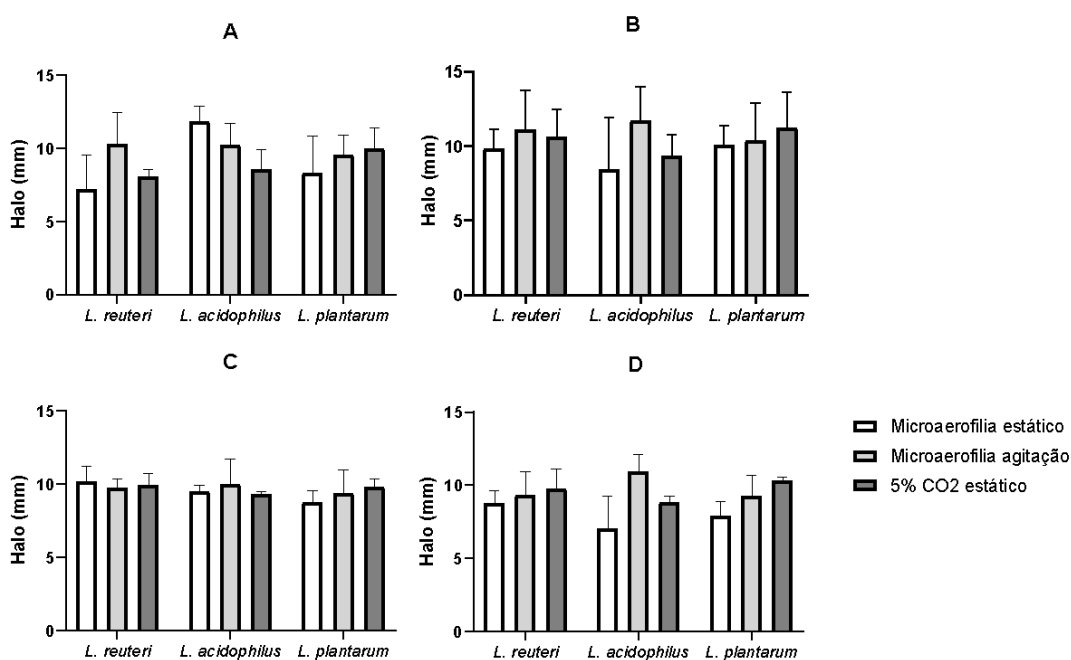


Figura 1- Diâmetro de inibição dos sobrenadantes livre de células produzidos pelas estirpes de “lactobacilos” em diversas condições de incubação sobre as estirpes de *Aliarcobacter butzleri* em estudo, Ab28/11 (A), DQ40A1 (B), INSA 2999 (C), INSA 2756 (D). Os resultados apresentados apresentam os valores médios±desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes. Os resultados foram analisados estatisticamente através do teste one-way ANOVA.

Quando comparado o efeito das condições de cultura das estirpes de “lactobacilos” estudadas na produção de compostos com atividade antimicrobiana verifica-se que não há diferença significativa na inibição de quatro estirpes de *A. butzleri* (Figura 1). Considerando que as condições de cultura testadas não demonstraram influenciar significativamente o crescimento das estirpes de “lactobacilos” em estudo, ou a viabilidade (Tabela 1), ou mesmo a produção de compostos antimicrobianos (Figura 1), para os futuros ensaios foi selecionada a condição de microaerofilia com agitação, devido

a ter um valor de DO_{600nm} maior e ter menor variabilidade na contagem de UFC/mL, e ser a condição de crescimento ótima das estirpes de *A. butzleri*.

Vários estudos relativamente a espécies de “lactobacilos” utilizam uma variedade de condições de crescimento e meios, sendo que os “lactobacilos” podem libertar uma variedade de compostos dependente destes fatores, como é o caso das bacteriocinas (Abbasiliasi *et al.*, 2017; Lim, 2010; Sidooski *et al.*, 2019). No entanto, os resultados obtidos neste trabalho demonstram não existir diferença na inibição, o que pode significar que o agente que leva a inibição das estirpes de *A. butzleri* está presente nas diferentes condições, suportando a seleção das condições de crescimento.

4.2. Resistência das bactérias a condições adversas encontradas no trato gastrointestinal

As bactérias no seu percurso pelo trato gastrointestinal são expostas a uma variedade de condições adversas como o pH ácido ou sais biliares. As bactérias patogénicas de forma geral têm mecanismos para ultrapassar e adaptar-se a estas condições adversas (Flint *et al.*, 2016). Para além das bactérias patogénicas, quando se assume o uso profilático ou terapêutico de probióticos, também estes têm a necessidade de ultrapassar estas barreiras.

4.3.1. Avaliação de sobrevivência a ambientes ácidos

Após ingestão, as bactérias têm de ultrapassar o pH ácido do estômago, que pode variar entre 2 e 7. Por sua vez, o pH ácido pode levar a lesões na membrana externa da bactéria ou causar uma perturbação do pH citoplasmático devido à exposição e influxo de iões H⁺ que resultam em danos no DNA e na inativação de enzimas, e levando a morte celular (Flint *et al.*, 2016). No entanto, as bactérias podem defender-se quando expostas a pH ácido através da regulação positiva da expressão de enzimas de defesa como carboxilases de aminoácidos, urease, entre outras, que ajudam a manter a homeostase do pH dentro da célula (Flint *et al.*, 2016).

Na figura 2 são apresentados os resultados da sobrevivência das estirpes de *A. butzleri* em estudo, a vários pH ácidos que se podem encontrar no hospedeiro.

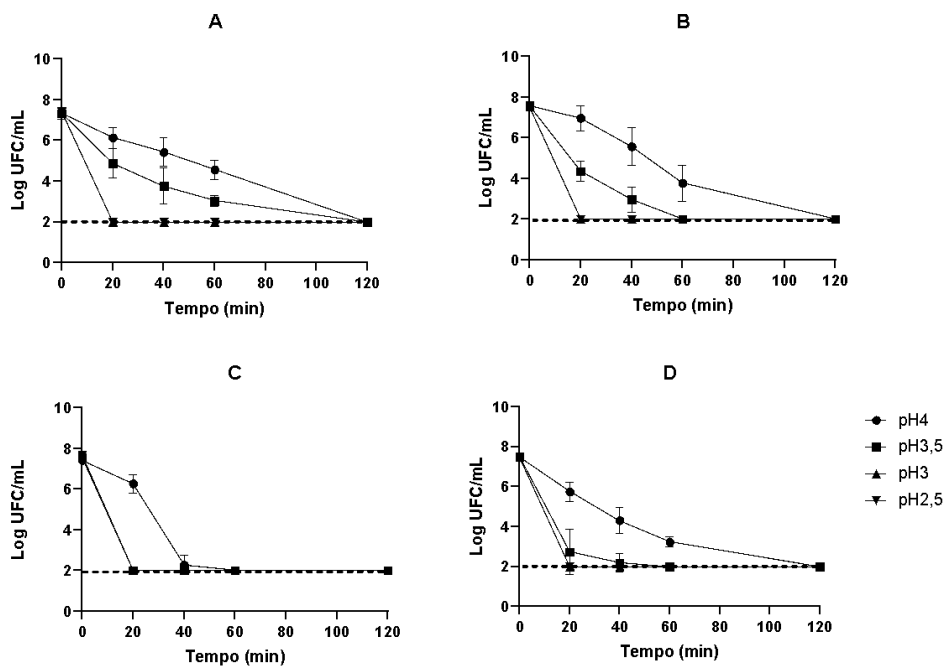


Figura 2 – Sobrevivência de *Aliarcobacter butzleri* AB28/11 (A), DQ40A1 (B), INSA 2999 (C), INSA 2756 (D) a pH ácidos de pH 4, 3,5, 3, 2,5, durante 2 horas. Estes resultados correspondem à média \pm desvio padrão do log UFC/mL em pelo menos três ensaios independentes. A linha a tracejado marca o limite de detecção do método.

Analisando os resultados obtidos na Figura 2, pode-se observar que em relação ao pH 4 todas as estirpes sobrevivem durante pelo menos 20 min, no entanto, após 40 min a estirpe *A. butzleri* INSA 2999 tem um declínio bastante acentuado em comparação com as estirpes INSA 2756, DQ40A1 e AB28/11, que ainda sobrevivem ao fim dos 40 min, demonstrando uma maior tolerância ao pH ácido. De facto, as estirpes de origem alimentar (Figura 2 A e B) demonstraram ser mais resistentes mesmo a pH 3,5, enquanto a pH 3 e 2,5 todas as estirpes de *A. butzleri* após 20 min de incubação não apresentam crescimento.

Este resultado vem contradizer os resultados obtidos por Isohanni *et al.*, (2013) que aponta para a incapacidade de *A. butzleri* sobreviver ao fim de 1 h a pH 4, mas estão em linha com o apresentado por Martins *et al.*, (2021) onde a maioria das estirpes de *A. butzleri* estudadas terão maior capacidade de sobrevivência a pH 4. No geral, estes resultados e outros sugerem que o perfil de suscetibilidade a pH ácido parece ser dependente de estirpe (Isohanni *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2021; Martins *et al.*, 2022).

Por sua vez, as estirpes de “lactobacilos” avaliadas demonstraram sobreviver aos diferentes pH testados durante os 120 min, mantendo a viabilidade inicial (Figura 3), em linha com a resistência a pH ácidos descrita para estas bactérias (Gao *et al.*, 2022; Singhal *et al.*, 2021).

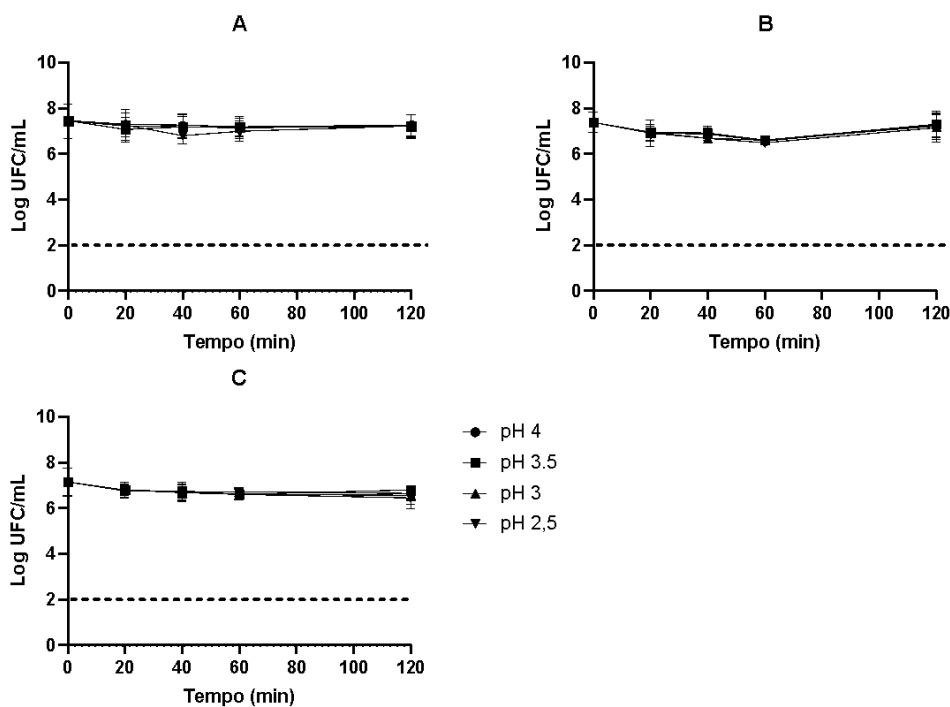


Figura 3 - Sobrevivência das estirpes *Limosilactobacillus reuteri* ATCC 23272 (A), *Lactobacillus acidophilus* LMG 9433 (B) e *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 8014 (C) a pH ácido de pH 4, 3,5, 3, 2,5 durante 2 horas. Estes resultados correspondem a média \pm desvio padrão do log UFC/mL em pelo menos três ensaios independentes. A linha a tracejado marca o limite de detecção do método.

Em suma, os resultados apresentados apontam para a dificuldade de *A. butzleri* sobreviver a pH ácido normalmente encontrado no estômago, apenas sobrevivendo durante 1 h a pH 4, enquanto as estirpes de “lactobacilos” terão capacidade de sobreviver a essa gama de pH. Apesar da dificuldade demonstrada pelas estirpes de *A. butzleri*, a sua sobrevivência à passagem no estômago pode ser possível devido ao pH poder variar de 2 a 7 com a alimentação (Flint *et al.*, 2016).

4.3.2. Avaliação da suscetibilidade a sais biliares

A bÍlis é uma barreira importante presente no trato gastrointestinal, sendo a exposição a esta no intestino uma grande barreira para muitas espécies de bactérias. A bÍlis tem a capacidade de afetar os fosfolípídios e proteínas das membranas celulares e perturbar a homeostase celular das bactérias. Os sais biliares são uma parte importante dos constituintes da bÍlis, pois altas concentrações destes levam a que os lípidos das membranas sejam rapidamente dissolvidos e causam dissociação de proteínas integrais da membrana (Begley *et al.*, 2005).

Na Tabela 2 pode-se observar que a maioria das estirpes de *A. butzleri* são tolerantes às concentrações fisiológicas de sais biliares observadas no humano, as quais se podem encontrar entre 0,2 e 2% (Mateus *et al.*, 2023). Assim, estes resultados sugerem que as concentrações de sais biliares normalmente presentes no intestino não são suficientes para impedir a colonização por *A. butzleri*.

Tabela 2 – Concentração mínima inibitória de sais biliares para quatro estirpes de *A. butzleri* e três espécies de “lactobacilos”

Estirpes	CMI
<i>Aliarcobacter butzleri</i> AB28/11	5%
<i>Aliarcobacter butzleri</i> DQ40A1	1,25%
<i>Aliarcobacter butzleri</i> INSA 2999	5%
<i>Aliarcobacter butzleri</i> INSA 2756	5%
<i>Limosilactobacillus reuteri</i> ATCC 23272	0,15%
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LMG 9433	0,3%
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ATCC 8014	0,6%

O efeito dos sais biliares em *A. butzleri* não tem sido muito estudado, no entanto, em 2023 um estudo mostrou que ao fim de 24 h de incubação, mas em cultura em meio líquido, a estirpe de *A. butzleri* não sobrevivia a 5% de concentração de sais biliares, sendo, no entanto, capaz de sobreviver em concentrações até 2% de sais biliares. Apesar das diferenças na metodologia, os resultados apresentados na Tabela 2 estão em linha com o obtido por Mateus *et al.* (2023), o que sugere a capacidade destas estirpes de *A. butzleri* ultrapassarem esta barreira do trato gastrointestinal demonstrando a potencial patogenicidade destas estirpes (Mateus *et al.*, 2023). Por sua vez as estirpes de “lactobacilos” em estudo são menos tolerantes às concentrações de sais biliares presentes no corpo humano. *L. plantarum* apresenta uma CMI de 0,6% demonstrando tolerar concentrações baixas de sais biliares encontradas no corpo humano. Por sua vez, *L. acidophilus* e *L. reuteri* apresentam uma tolerância ainda mais baixa, demonstrando que poderão não ter a capacidade de resistir às concentrações de sais biliares presentes no corpo humano.

Estes resultados não vão de encontro a outros trabalhos que referem que espécies de “lactobacilos”, na sua maioria, sobrevivem às condições encontradas no trato gastrointestinal, nomeadamente estirpes de *L. acidophilus* e *L. reuteri*, sendo que este último terá capacidade de sobreviver até 1% (Gao *et al.*, 2022). Em contrapartida, está descrito que uma estirpe de *L. plantarum* não terá capacidade de sobreviver acima de 0,5% de sais biliares, o que vai de encontro aos 0,6% de CMI obtidos neste estudo,

realçando que estes resultados são dependentes das estirpes. Em suma, estes resultados vêm demonstrar que os “lactobacilos” têm dificuldade em ultrapassar a barreira dos sais biliares no trato gastrointestinal, podendo justificar a sua fraca capacidade de colonização após o consumo destes (Singhal *et al.*, 2021).

4.3. Avaliação do crescimento de *Aliarcobacter butzleri* na presença de sobrenadante livre de células produzidos pelos “lactobacilos” em estudo

Para este ensaio e os restantes foi selecionada a estirpe de *A. butzleri* AB28/11, pois apresentou uma maior capacidade de resistir às condições associadas ao percurso do trato gastrointestinal em relação às restantes estirpes estudadas.

Os probióticos por norma libertam uma variedade de compostos antimicrobianos que estão presentes no seu SLC. Os “lactobacilos” por exemplo são conhecidos por libertar ácido láctico podendo este causar interferência no crescimento das estirpes patogénicas (Danilova *et al.*, 2019; Wang & Zeng, 2022). Com isso em mente foram testados os SLC das diferentes estirpes de “lactobacilos” no crescimento da estirpe *A. butzleri* AB28/11, a diferentes condições.

Nas figuras 4 e 5 pode-se observar o efeito dos sobrenadantes tratados a temperatura de 100 °C e com pH ajustado a 5,5 e 7, no crescimento de *A. butzleri*.

Analisando as Figuras 4 e 5, podemos verificar que o crescimento da estirpe de *A. butzleri* AB28/11 é inibido às concentrações de SLC de 12,5% nos casos de *L. plantarum*, e de 25% para *L. acidophilus* e *L. reuteri*, no entanto a atividade antimicrobiana é inativada quando o pH é ajustado a 5,5 ou 7 (Figura 4). Um perfil similar de inibição ao dos SLC não tratados é observado quando estes SLC sofrem um tratamento térmico a 100 °C, sem ajuste de pH (Figura 5).

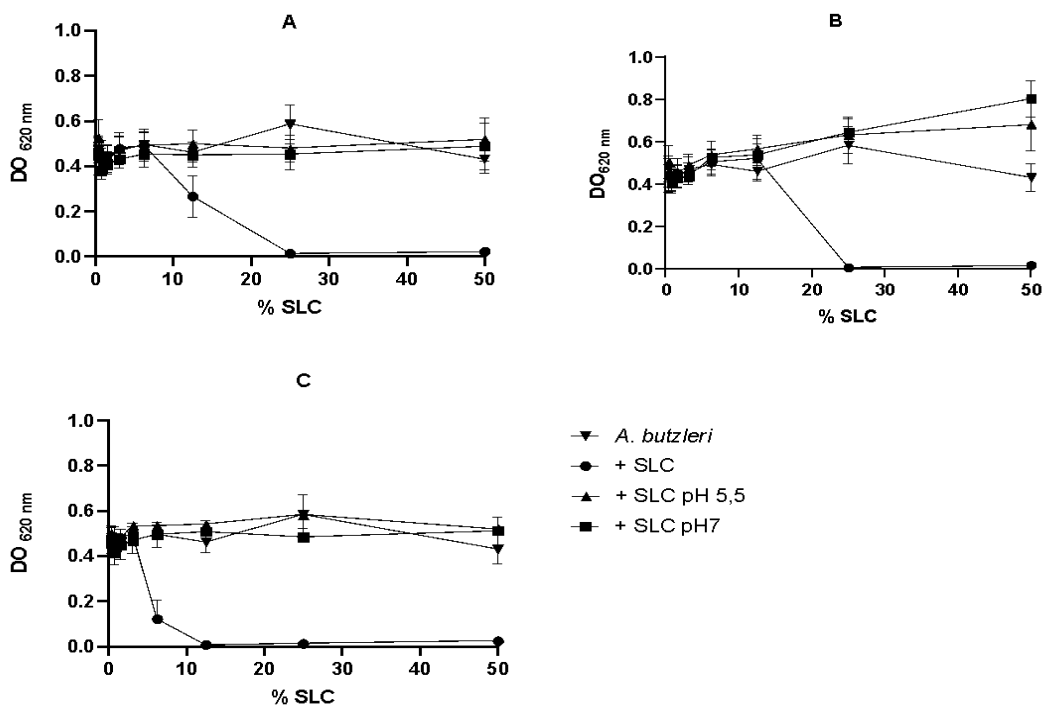


Figura 4 – Efeito do sobrenadante livre de células *Limosilactobacillus reuteri* (A), *Lactobacillus acidophilus* (B) e *Lactiplantibacillus plantarum* (C) na estirpe *Aliarcobacter butzleri* AB28/11, em diferentes concentrações, usado sem tratamento com o pH variando de 3 a 4 ou ajustando o pH a 5,5 ou a 7. Estes resultados correspondem à média \pm desvio padrão do log UFC/mL em pelo menos três ensaios independentes.

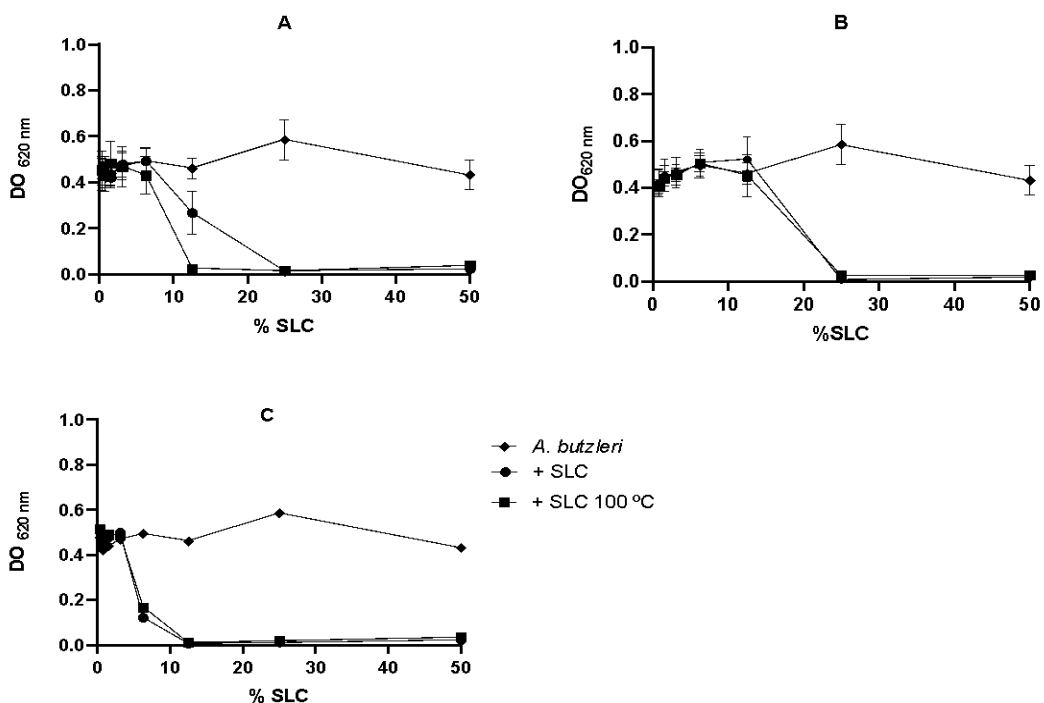


Figura 5 - Efeito do sobrenadante livre de células de *Limosilactobacillus reuteri* (A), *Lactobacillus acidophilus* (B) e *Lactiplantibacillus plantarum* (C) sobre *Aliarcobacter butzleri* AB28/11, em diferentes concentrações, usado sem tratamento, após tratamento a 100°C. Estes resultados correspondem à média \pm desvio padrão do log UFC/mL em pelo menos três ensaios independentes.

Os resultados apresentados sugerem que a inibição de crescimento de *A. butzleri* pelo SLC se deve à acidez deste, considerando que o pH dos sobrenadantes varia entre 2,5 e 4, e como observado na seção 4.2. as estirpes de *A. butzleri* não sobrevivem a pH ácidos. Estes resultados estão de acordo com outros estudos, pois estes demonstraram não existir inibição de diversas bactérias patogênicas com o tratamento de temperatura a 100 °C. Quando os sobrenadantes têm o pH ajustado a 7 e 5,5 haverá uma eliminação da inibição do crescimento de *A. butzleri*, o que está em concordância com outros estudos, mas estes são altamente dependentes da espécie bacteriana e mesmo da estirpe em estudo. De facto, estirpes mais resistentes a pH ácidos obtêm resultados diferentes dos apresentados neste estudo (Danilova *et al.*, 2019; Scillato *et al.*, 2021).

4.4. Cocultura de *Aliarcobacter butzleri* com cada uma das estirpes de “lactobacilos” em estudo

A avaliação da sobrevivência em cocultura é essencial para a avaliação do efeito probiótico das estirpes de “lactobacilos” quando na presença de estirpes *A. butzleri*. Este ensaio é utilizado para avaliar a sobrevivência competitiva entre os “lactobacilos” e *A. butzleri* (Peng *et al.*, 2018), pelo que o crescimento de *A. butzleri* em diferentes meios de crescimento com TSB, MRS e TSB/MRS em cocultura com as estirpes de “lactobacilos” em estudo foi avaliado (Figuras 6, 7 e 8).

Analisando a Figura 6A verifica-se que na presença de *L. reuteri*, em meio TSB, ao fim de 24 h, o crescimento da estirpe *A. butzleri* AB28/11 não é inibido, não havendo também alterações ao fim de 48 h. Quando é usado o meio MRS verifica-se uma inibição do crescimento de *A. butzleri* AB 28/11, mesmo na ausência de *L. reuteri* (Figura 6B). Por sua vez, em meio TSB e MRS nas proporções de 1:1 (figura 6C), verifica-se uma redução do log UFC/mL, no entanto, verifica-se que a estirpe *A. butzleri* AB28/11 não apresenta crescimento ao fim de 24h ou 48 h quando em cocultura com a estirpe de *L. reuteri*.

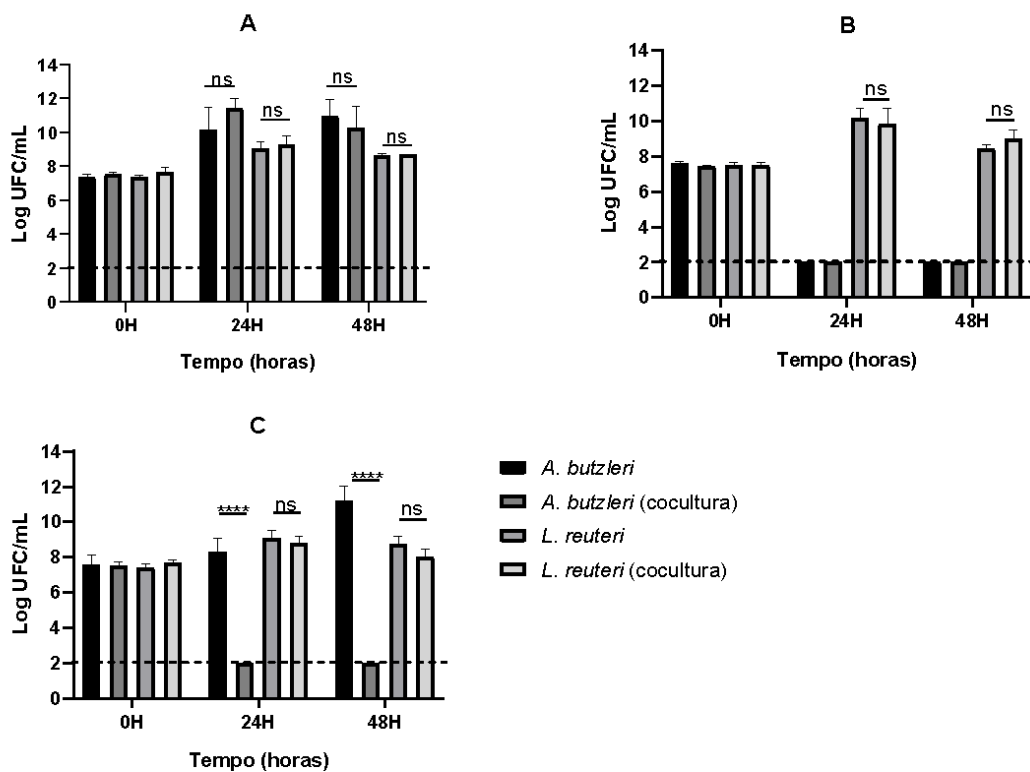


Figura 6 - Culturas de *Aliarcobacter butzleri* e *Limosilactobacillus reuteri* e coculturas de *Aliarcobacter butzleri* e *L. reuteri*, em diferentes meios de cultura, TSB (A), MRS (B) ou TSB e MRS (C) na proporção de 1:1, durante 48 h. Os resultados apresentados apresentam os valores médios \pm desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes. A linha a tracejado marca o limite de detecção do método. Os resultados foram analisados estatisticamente através do teste t de student. ns: $p > 0,05$, **** $p < 0,0001$.

Considerando o potencial efeito da cocultura de *A. butzleri* com *L. acidophilus*, verifica-se que, contrariamente ao observado para *L. reuteri*, quando na presença de *L. acidophilus* em meio TSB, o crescimento da estirpe *A. butzleri* AB28/11 é inibido às 24h e às 48 h (Figura 7A). Do mesmo modo, quando em cocultura com a estirpe de *L. acidophilus* em meio TSB e MRS nas proporções de 1:1, *A. butzleri* AB28/11 é inibida às 24 e 48 h (Figura 7B e 7C).

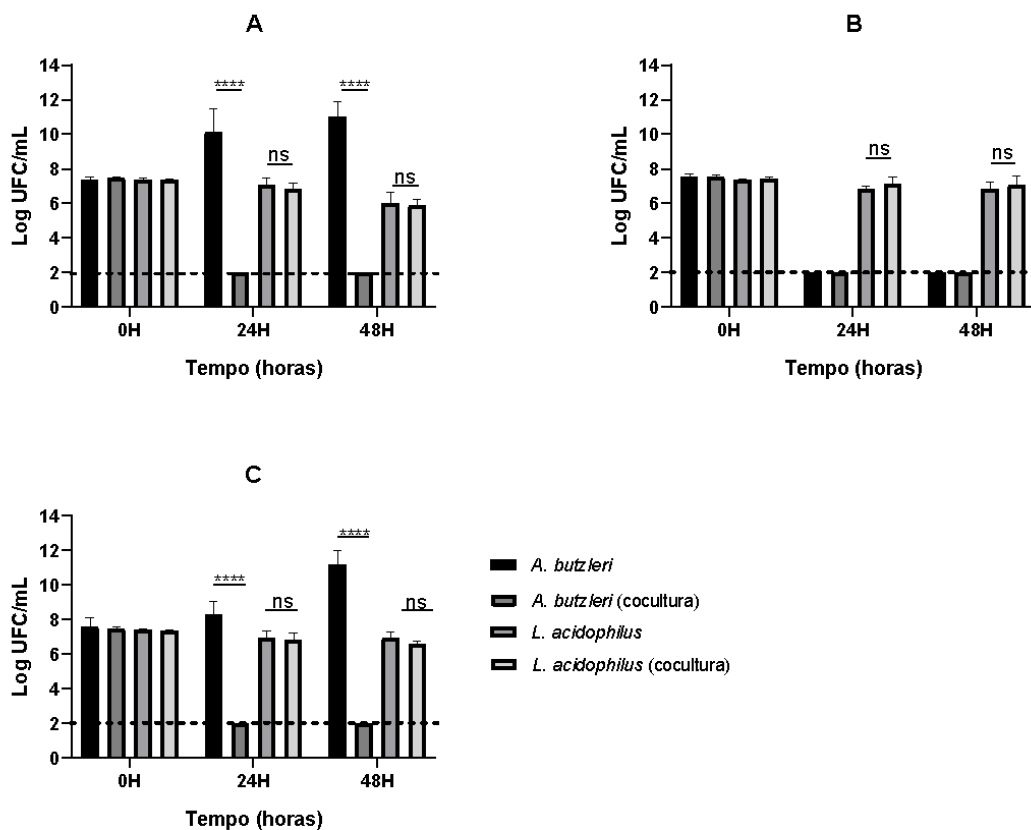


Figura 7 – Culturas de *Aliarcobacter butzleri* e *Lactobacillus acidophilus* e coculturas de *Aliarcobacter butzleri* com *Lactobacillus acidophilus*, em diferentes meios de cultura, TSB (A), MRS (B) ou TSB e MRS (C) na proporção de 1:1, durante 48 h. Os resultados apresentados apresentam os valores médios \pm desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes. A linha a tracejado marca o limite de detecção do método. Os resultados foram analisados estatisticamente através do teste t de student. ns: $p > 0,05$, **** $p < 0,0001$.

Na Figura 8 pode-se ver o crescimento de *A. butzleri* em diferentes meios de crescimento com TSB, MRS e TSB e MRS em conjunto, e em cocultura com a estirpe *L. plantarum*. Quando na presença de *L. plantarum* o perfil geral obtido é semelhante ao observado com *L. acidophilus*, ocorrendo inibição de *A. butzleri* em meio TSB e TSB com MRS.

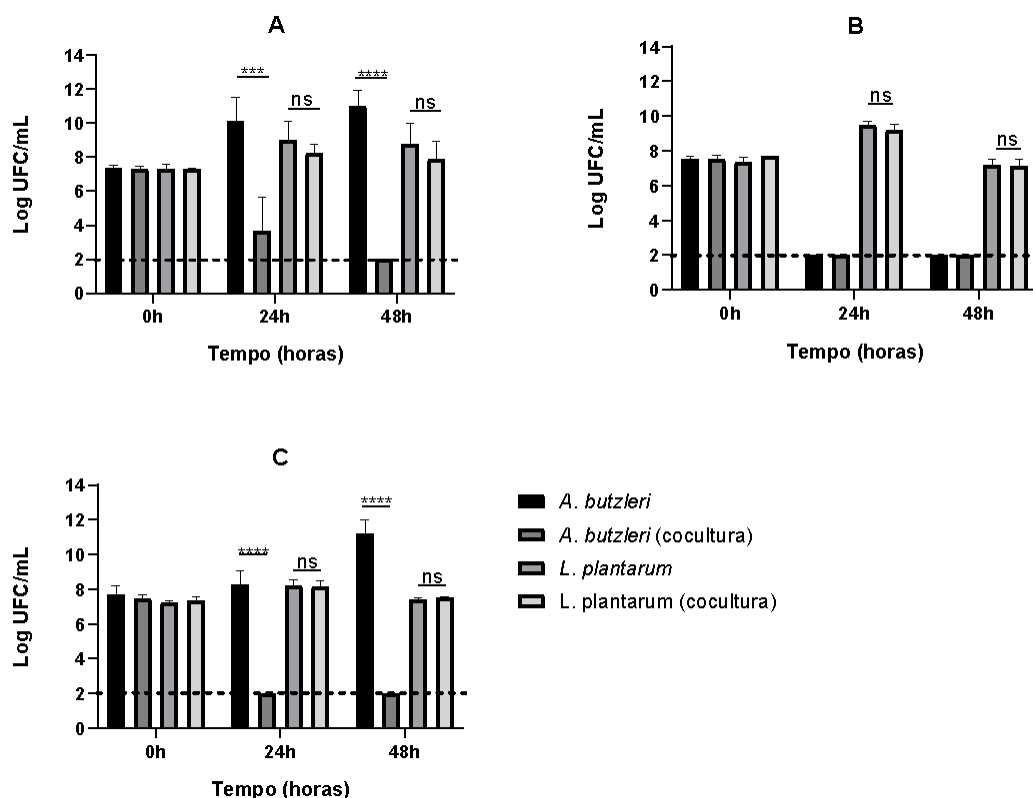


Figura 8. Culturas de *Aliarcobacter butzleri* e *Lactiplantibacillus plantarum* e coculturas de *Aliarcobacter butzleri* e *Lactiplantibacillus plantarum*, em diferentes meios de cultura, TSB (A), MRS (B) ou TSB e MRS (C) na proporção de 1:1, durante 48 horas. Os resultados apresentados apresentam os valores médios \pm desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes. A linha a tracejado marca o limite de detecção do método. Os resultados foram analisados estatisticamente através do teste t de student. ns: $p > 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Avaliando estes resultados em conjunto podemos ver que existem diferenças quando a cocultura é feita em meio TSB, pois cada estirpe de “lactobacilos” tem resultados diferentes potenciando inibição, inibição parcial, ou não apresentando qualquer inibição do crescimento de *A. butzleri*, ao fim de 24 h. Ao fim de 48 h, *L. acidophilus* e *L. plantarum* mostraram inibir o crescimento da estirpe AB28/11, enquanto *L. reuteri* não inibe o crescimento em meio TSB. Quanto à mistura de meios de TSB e MRS na proporção 1:1, os resultados são idênticos para todas as estirpes de “lactobacilos”, verificando-se uma inibição do crescimento da estirpe *A. butzleri* AB 28/11, ao fim de 24h e 48 h. O diferente perfil de inibição das estirpes de “lactobacilos” nos diferentes meios poderá estar associado à diferente libertação de compostos antibacterianos por parte dos “lactobacilos”, potencialmente tornando o meio mais ácido com a libertação de ácido láctico, acontecendo em maior quantidade no meio MRS. O pH poderá ser a razão para ocorrer inibição nos diferentes meios por parte dos “lactobacilos”, mas com MRS também poderá haver a produção de alguma molécula que não seja passível de ser produzida por *L. reuteri* em TSB.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos para outras bactérias patogênicas quando na presença de “lactobacilos”, como o caso de *Campylobacter jejuni* para o qual o crescimento é inibido pela presença de “lactobacilos”, em particular das espécies de *L. acidophilus* e *Lacticaseibacillus casei* (Campana *et al.*, 2012; Tabashsum *et al.*, 2018). Outro estudo com *L. casei* mostrou a inibição de um variado número de bactérias patogênicas, como *E. coli*, *Salmonella enterica serovar Typhimurium* e *Listeria monocytogenes*, quando em cocultura (Peng *et al.*, 2015).

4.5 Avaliação do efeito do sobrenadante livre de células na formação de biofilmes

A formação de biofilme é um mecanismo de defesa usado amplamente por bactérias, sendo um fator importante para a sobrevivência e patogenicidade destas bactérias. O biofilme torna as bactérias patogênicas mais resistentes a agentes antimicrobianos devido à redução da penetração dos antimicrobianos, para além de tornar o metabolismo bacteriano mais lento fazendo com que a atividade antimicrobiana seja diminuída e ajudando a sobrevivência em condições hostis (Zamani *et al.*, 2017).

Neste estudo avaliou-se o potencial de inibição dos SLC das estirpes probióticas em estudo na formação de biofilmes da estirpe de *A. butzleri* AB28/11.

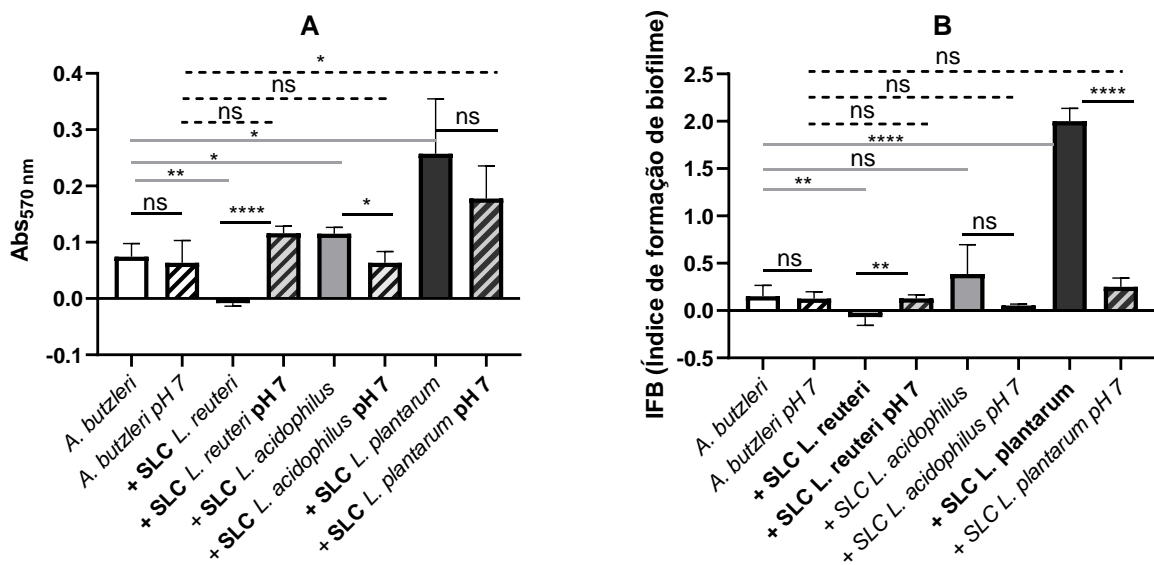


Figura 9 – Efeito dos SLC das estirpes de “lactobacilos” na formação de biofilme por *Aliarcobacter butzleri* AB28/11, considerando a revelação com violeta de cristal e a absorvância a 570 nm e o índice de formação de biofilme (B). Os resultados apresentados apresentam os valores médios ± desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes. ns: $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$ pelo teste t de student.

Como podemos observar na Figura 9, a estirpe de *A. butzleri* AB 28/11, na presença de SLC de *L. plantarum* ou *L. acidophilus*, apresenta uma potenciação significativa da

formação de biofilme, enquanto o SLC da estirpe *L. reuteri* demonstra inibir totalmente a formação de biofilme. No entanto, quando se considera a formação de biofilme em função do crescimento de *A. butzleri*, o SLC de *L. plantarum* demonstra potencializar, enquanto o de *L. acidophilus* demonstra não afetar a formação de biofilme da estirpe de *A. butzleri*. Relativamente ao SLC de *L. reuteri*, mantém atividade de inibição da formação de biofilme em função do crescimento da estirpe de *A. butzleri*. Estes resultados relativos a *L. plantarum* não estão de acordo com um estudo de Zamani *et al* (2017) que indica que o SLC de *L. plantarum* reduzia ou inibia totalmente a formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* (Zamani *et al.*, 2017). Outro estudo relativamente a uma estirpe de *L. reuteri* indicava que havia redução significativa ao fim de 24 h, mas ao fim de 48 h não é significativa na formação de biofilme de estirpes de *Paenibacillus larvae* (Babrud *et al.*, 2019).

Por sua vez, quando o pH dos sobrenadantes é ajustado a 7 (figura 9), os resultados são ligeiramente diferentes. Em relação a *L. reuteri*, quando o pH do SLC é ajustado a 7, existe uma alteração do seu comportamento, deixando de inibir a formação de biofilmes, assim podendo o pH ácido ser uma das causas da inibição do biofilme por *L. reuteri*, possivelmente associado a uma inibição do crescimento de *A. butzleri*. Relativamente a *L. plantarum*, apresenta alterações de inibição (Figura 9) havendo uma redução no IFB quando o pH do SLC é ajustado a pH 7, aparentando diminuir a potenciação de formação de biofilme. Em relação a *L. acidophilus*, não existe qualquer alteração estatística do seu IFB em relação ao sobrenadante livre de células com pH a 7. Estes resultados podem ser justificados com a redução de stress causado na estirpe de *A. butzleri*, pois esta apresenta dificuldades de sobrevivência a pH mais ácidos como demonstrado anteriormente neste estudo, isto pode vir de acordo com (Babrud *et al.*, 2019) que demonstrou existir uma diferença na inibição da formação de biofilme de *Paenibacillus larvae* por parte *L. reuteri* quando os SLC são ajustados a pH superiores.

4.5 Avaliação da adesão de *Aliarcobacter butzleri* e estirpes de “lactobacilos” à linha celular Caco-2

A adesão a células epiteliais intestinais é um importante fator e pré-requisito dos probióticos, conseqüentemente também é um importante fator na patogenicidade das bactérias. Assim, inicialmente procedeu-se à avaliação do índice de adesão dos “lactobacilos” em estudo e da estirpe *A. butzleri* AB28/11, à linha celular Caco-2.

Tabela 3 – Índice de adesão a linha celular Caco-2 para *A. butzleri* e três espécies de “lactobacilos” em estudo

Estirpes	Índice de adesão	Índice de adesão (microcolônias)
<i>Aliarcobacter butzleri</i> AB28/11	10,18± 1,95	0
<i>Limosilactobacillus reuteri</i> ATCC 23272	30,28± 3,07	217,75± 50,48
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LMG 9433	4,27± 1,40	0
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ATCC 8014	3,48± 0,44	0

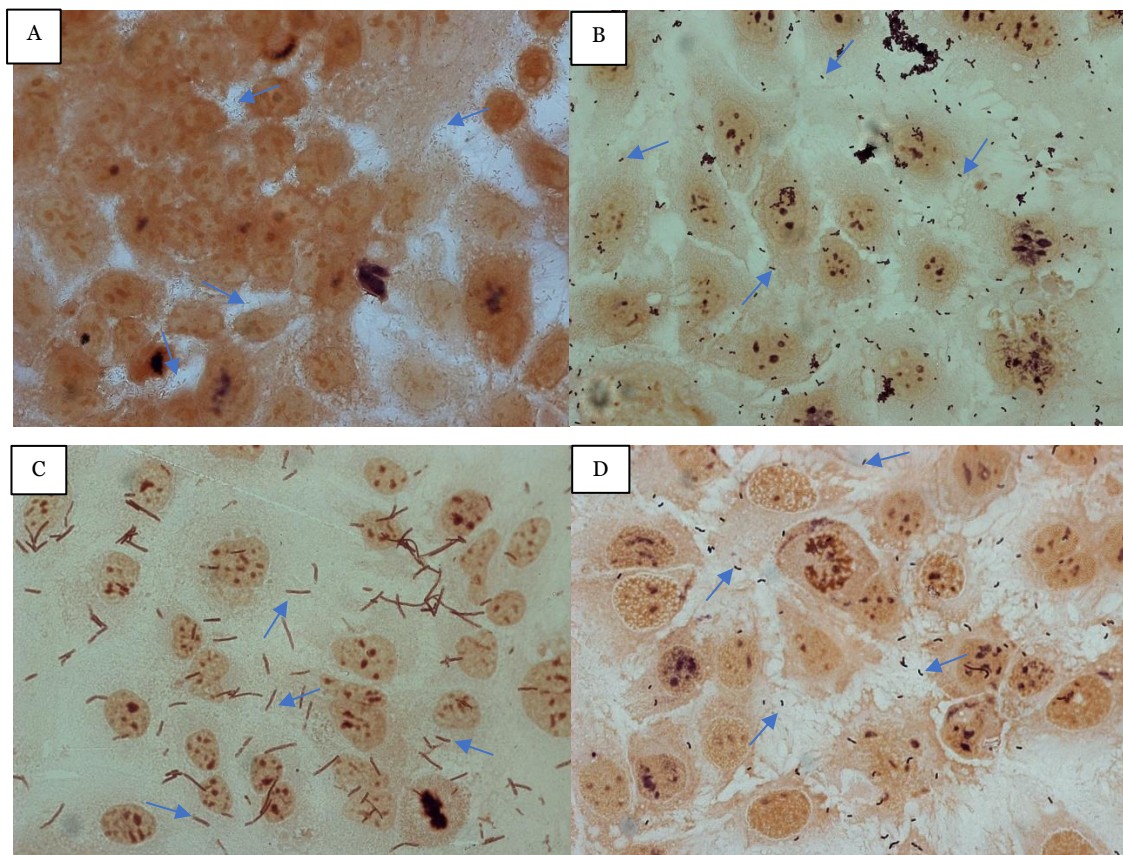


Figura 10 – Campo aleatório de microscópio, representativo da adesão de: *Aliarcobacter butzleri* AB28/11(A), *Limosilactobacillus reuteri* ATCC 23272 (B), *Lactobacillus acidophilus* LMG 9433 (C) e *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 8014 (D). As setas indicam as bactérias. A ampliação usada foi de 63x. A coloração utilizada foi Coloração de Gram.

Analisando a Tabela 3 e a Figura 10 podemos verificar que a estirpe *A. butzleri* AB28/11 apresenta um maior índice de adesão que as estirpes *L. plantarum* e *L. acidophilus*. Por sua vez, *A. butzleri* apresenta menor índice de adesão que a estirpe *L. reuteri*, sendo a adesão desta acompanhada por um padrão de agregação bacteriana não verificado nas outras estirpes estudadas.

A adesão é o primeiro passo para os probióticos exercerem efeitos benéficos no hospedeiro, podendo levar à prevenção da adesão de estirpes patogênicas, por competição pelos recetores, ou até à interação com a superfície de adesão destas levando a uma diminuição da virulência das bactérias patogênicas (Ding *et al.*, 2021; Taha-Abdelaziz *et al.*, 2019).

Estes resultados demonstram que as estirpes em estudo de “lactobacilos” em grande parte apresentam uma adesão baixa a células de Caco-2, com a exceção de *L. reuteri* que apresenta um índice de adesão comparativamente elevado. Este padrão pode dever-se à sua elevada autoagregação, sendo que a literatura demonstra que a capacidade de autoagregação estará relacionada com capacidade de adesão (Kos, 2002), e poderá assim justificar os resultados obtidos neste ensaio. Outro estudo feito por Tuo *et al.*, 2013, demonstrou que a adesão a células Caco-2 é estirpe dependente. demonstrando que diferentes estirpes de lactobacilos tinham capacidades de adesão diferentes, com estirpes de *L. plantarum* exibindo diferentes padrões de adesão e até de autoagregação (Tuo *et al.*, 2013). Neste estudo, os resultados obtidos para *L. plantarum* não estão de acordo com a literatura, tendo sido demonstrado por Tuo *et al.*, 2013 alta adesão a células Caco-2 por parte das estirpes de *L. plantarum*. Um estudo por Tuomola & Salminen, 1998 demonstrou uma capacidade de adesão semelhante entre *L. plantarum* e *L. acidophilus*. o que vai ao encontro dos resultados obtidos (Tuomola & Salminen, 1998). Para a estirpe de *L. reuteri* não foi encontrado nenhum estudo nesta linha celular, sendo este o primeiro estudo.

4.6 Avaliação da competição, deslocamento e exclusão de *Aliarcobacter butzleri* com as estirpes de probióticos na adesão e invasão à linha celular Caco-2

A adesão e invasão são um ponto importante na avaliação da patogenicidade da bactéria. Existem vários estudos que demonstram esta importância para uma variedade de

estirpes de *A. butzleri*, no entanto desconhece-se o comportamento desta bactéria quando em presença de “lactobacilos”. Assim, este estudo foi feito para avaliar a adesão e invasão da estirpe de *A. butzleri* AB28/11 na presença das estirpes de “lactobacilos” em estudo, quando competindo em simultâneo entre elas, na exclusão e no deslocamento de *A. butzleri* na adesão e invasão de células Caco-2. Isto considerando, que as estirpes probióticas devem ser capazes de competir, excluir e deslocar bactérias patogénicas para serem consideradas eficazes como probióticos. Assim foi avaliado o impacto dos “lactobacilos” na atenuação de virulência da estirpe de *A. butzleri*.

Na Figura 11 pode-se observar que, quando em competição, nenhuma das estirpes probióticas estudadas afeta a capacidade da estirpe *A. butzleri* AB28/11 em aderir a células Caco-2, não tendo qualquer efeito de potenciação ou de inibição. No entanto, a adesão das estirpes de *L. acidophilus* e de *L. plantarum* são afetadas pela presença da estirpe *A. butzleri* AB28/11, levando a uma diminuição da sua adesão. Por sua vez, a estirpe de *L. reuteri* não apresenta alteração significativa na sua adesão quando em competição com a estirpe *A. butzleri* AB28/11, em células Caco-2, em linha com o seu maior índice de adesão.

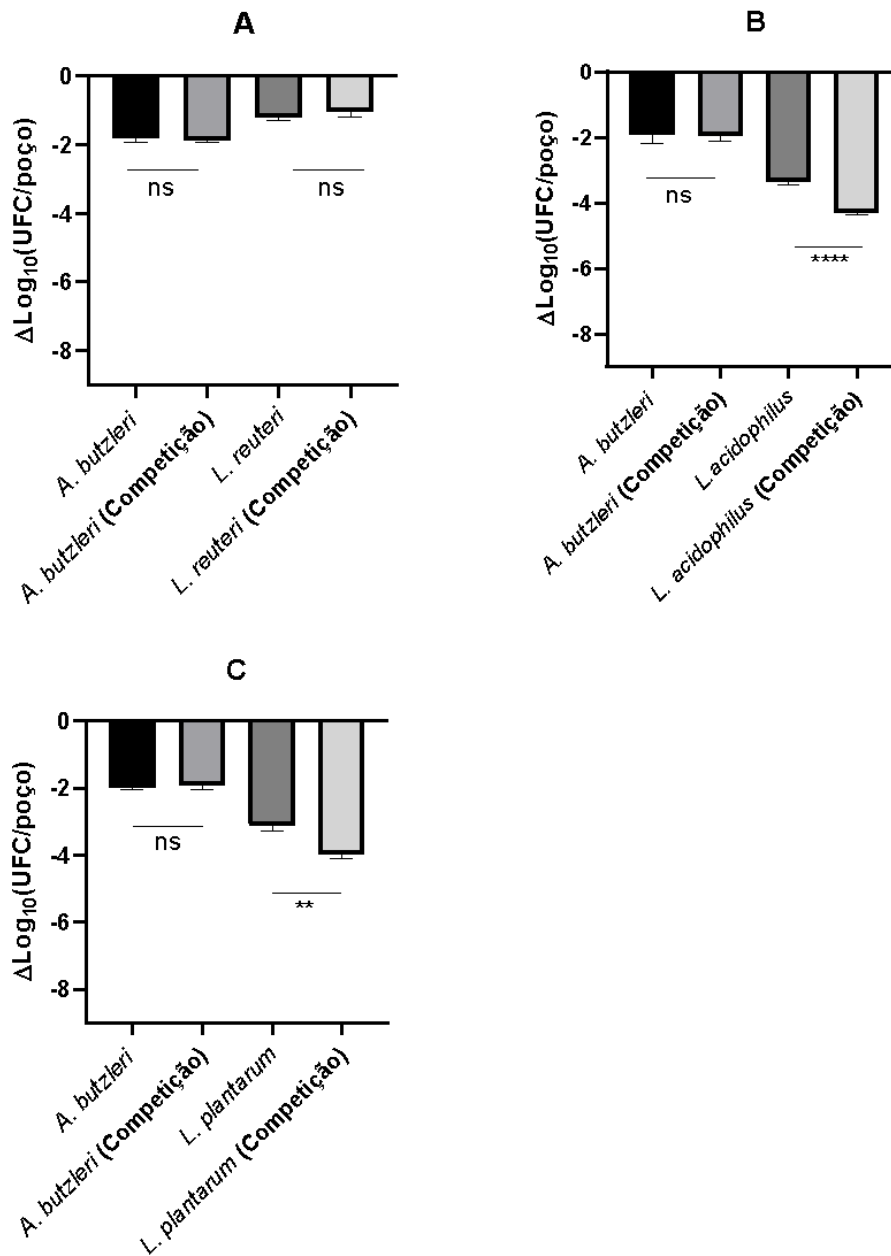


Figura 11 – Capacidade de adesão da estirpe de *Aliarcobacter butzleri* AB28/11 a células Caco-2 isoladamente ou em competição com as várias estirpes de “lactobacilos”: *Limosilactobacillus reuteri* ATCC 23272 (A), *Lactobacillus acidophilus* LMG 9433 (B) e *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 8014 (C). Os resultados apresentados apresentam os valores médios \pm desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes. ns: $p > 0,05$, ** $p < 0,01$ **** $p < 0,0001$ pelo teste t de student.

Quando considerando o potencial de invasão, podemos observar na Figura 12 que nenhuma das estirpes de “lactobacilos” apresenta potencial para inibir ou potenciar a capacidade de invasão da estirpe *A. butzleri* AB28/11 a células Caco-2, quando competindo. Ao contrário do que acontece na capacidade de adesão da maioria das estirpes de “lactobacilos” estudadas, estas não apresentam redução de invasão quando em competição com estirpe *A. butzleri* AB28/11.

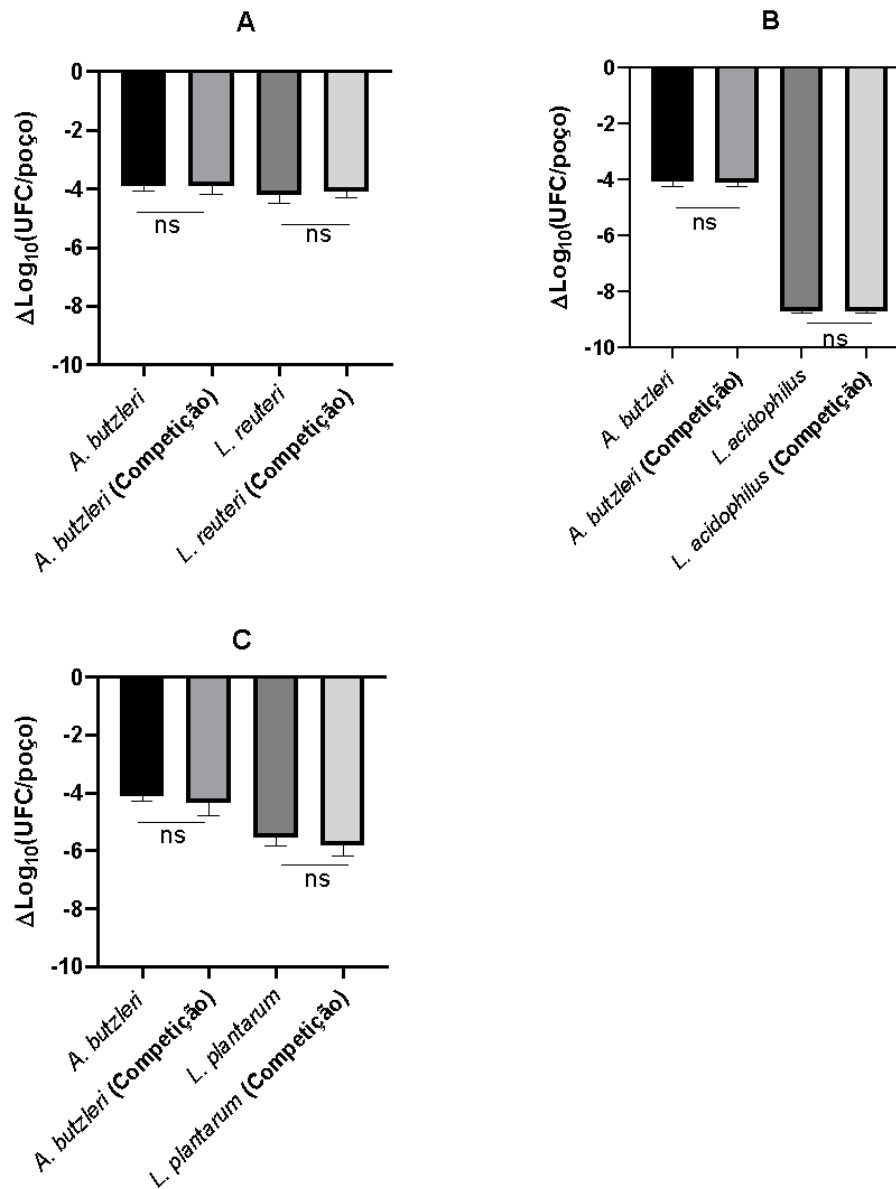


Figura 12 – Capacidade de invasão da estirpe de *Aliarcobacter butzleri* e “lactobacilos” a células de Caco-2 isoladamente e em competição com as várias estirpes de “lactobacilos”: *Limosilactobacillus reuteri* ATCC 23272 (A), *Lactobacillus acidophilus* LMG 9433 (B) e *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 8014 (C). Os resultados apresentados apresentam os valores médios \pm desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes. ns: $p > 0,05$ pelo teste t de student.

Depois de avaliada a capacidade de adesão e invasão quando competindo, foi estudado a capacidade de os “lactobacilos” em estudo deslocarem a estirpe *A. butzleri* AB28/11 quando esta já está aderida às células Caco-2.

Na Figura 13 pode-se verificar que quando as estirpes de lactobacilos são colocadas posteriormente à estirpe de *A. butzleri*, existe uma diferença significativa na adesão desta às células Caco-2, existindo uma diminuição significativa de adesão por parte da estirpe AB28/11.

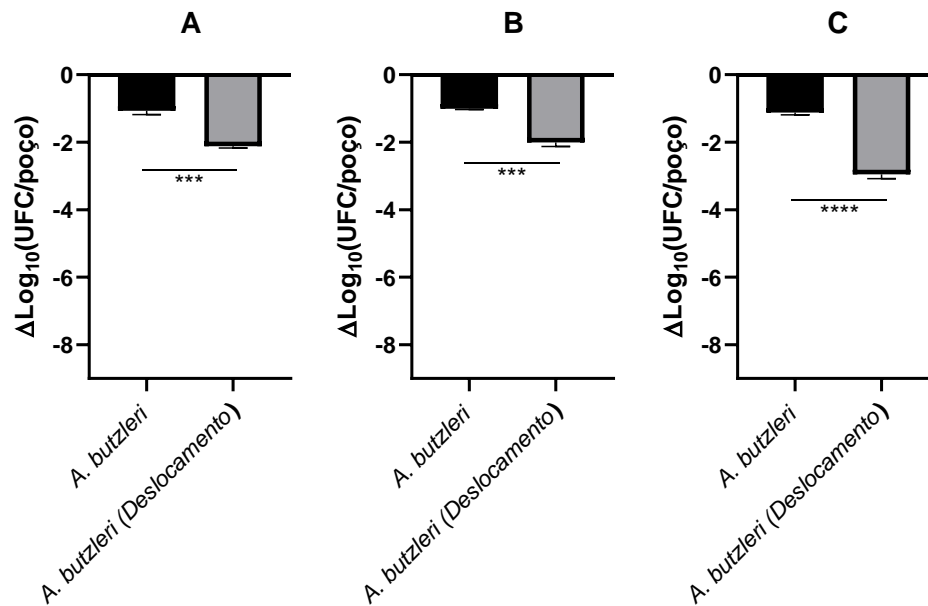


Figura 13 – Capacidade de adesão da estirpe de *Aliarcobacter butzleri* e “lactobacilos” a células de Caco-2 isoladamente e no ensaio de deslocamento com as várias estirpes de “lactobacilos”: *Limosilactobacillus reuteri* ATCC 23272 (A), *Lactobacillus acidophilus* LMG 9433 (B) e *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 8014 (C). Os resultados apresentados apresentam os valores médios ± desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes. ns: $p > 0,05$ pelo teste t de student.

Por sua vez, na Figura 14 pode-se constatar que nenhuma das estirpes de “lactobacilos” em estudo tem influência na invasão da estirpe de *A. butzleri* AB28/11, quando feito o ensaio de deslocamento.

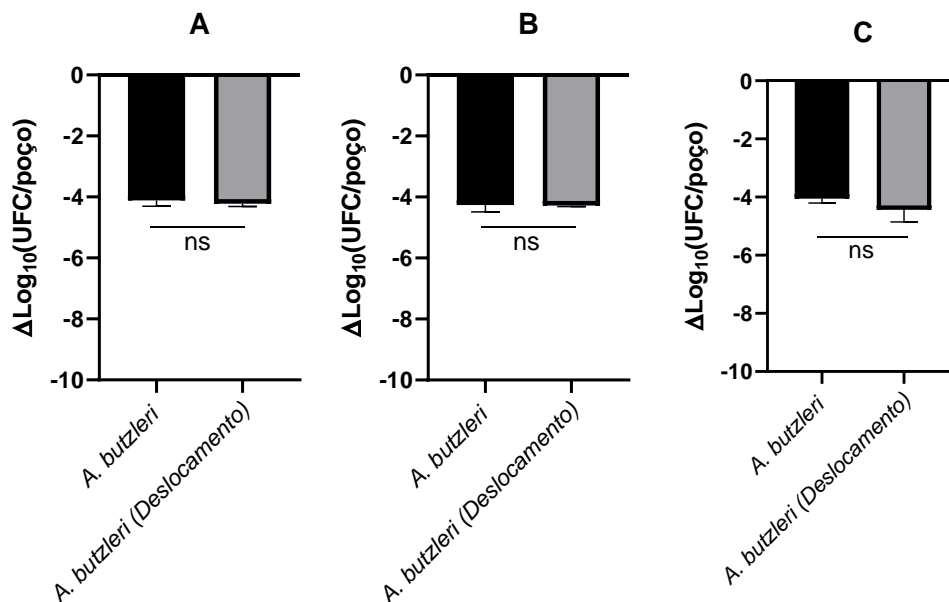


Figura 14 – Capacidade de invasão da estirpe de *Aliarcobacter butzleri* e “lactobacilos” a células de Caco-2 isoladamente e no ensaio de deslocamento com as várias estirpes de “lactobacilos” *Limosilactobacillus reuteri* ATCC 23272 (A), *Lactobacillus acidophilus* LMG 9433 (B) e *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC

8014 (C). Os resultados apresentados apresentam os valores médios \pm desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes. ns: $p > 0,05$ pelo teste t de student.

Por último, foi avaliada a capacidade de os “lactobacilos” excluírem *A. butzleri*, limitando a sua adesão e invasão. Na Figura 15 podem observar-se os resultados da adesão de *A. butzleri*, posterior à adesão por “lactobacilos” em estudo. Neste caso, a pré-adesão de “lactobacilos” levou a uma diminuição da adesão de *A. butzleri* AB28/11 por *L. reuteri* e *L. plantarum*, mas o mesmo não se verificou com *L. acidophilus*.

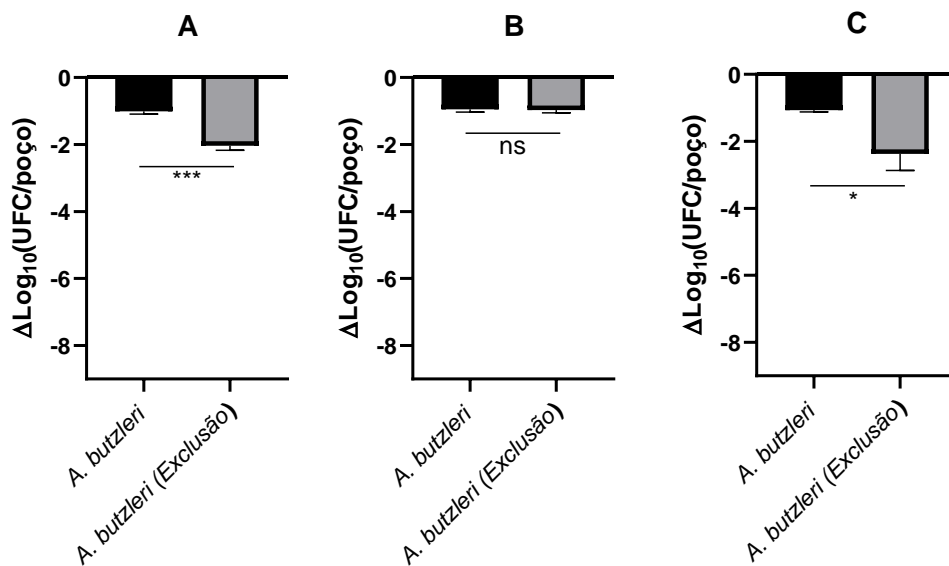


Figura 15 – Capacidade de adesão da estirpe de *Aliarcobacter butzleri* e “lactobacilos” a células de Caco-2 isoladamente e no ensaio de exclusão com as várias estirpes de “lactobacilos”: *Limosilactobacillus reuteri* ATCC 23272 (A), *Lactobacillus acidophilus* LMG 9433 (B) e *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 8014 (C). Os resultados apresentados apresentam os valores médios \pm desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes. ns: $p > 0,05$ pelo teste t de student.

Na Figura 16, como previamente observado no ensaio de competição e de deslocamento, não existe alteração da invasão da estirpe *A. butzleri* AB28/11 na presença das estirpes de “lactobacilos”.

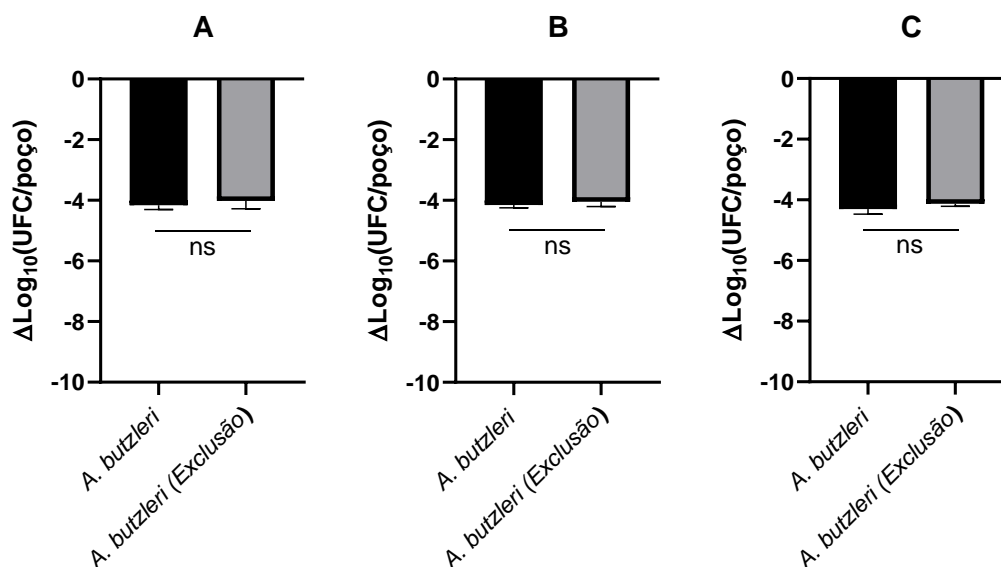


Figura 16 – Capacidade de invasão da estirpe de *Aliarcobacter butzleri* e “lactobacilos” a células de Caco-2 isoladamente e no ensaio de exclusão com as várias estirpes de “lactobacilos”: *Limosilactobacillus reuteri* ATCC 23272 (A), *Lactobacillus acidophilus* LMG 9433 (B) *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 8014 (C). Os resultados apresentados apresentam os valores médios \pm desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes. ns: $p > 0,05$ pelo teste t de student.

De forma geral, estes resultados demonstram que a maioria das estirpes de “lactobacilos” estudadas não aparentam ter efeito na adesão ou invasão da estirpe de *A. butzleri*, não tendo sido verificado nem potenciação, nem diminuição quando em competição. No entanto, verificou-se em alguns casos a inibição, por parte da estirpe *A. butzleri* AB28/11, da adesão das estirpes de “lactobacilos” como é o caso de *L. acidophilus* e de *L. plantarum* quando em competição. Por outro lado, no caso do ensaio de deslocamento e exclusão, as estirpes de lactobacilos demonstram conseguir afetar a adesão da estirpe de *A. butzleri*, sendo que não tem efeito na invasão desta. Enquanto nos ensaios de competição era demonstrado que as estirpes de “lactobacilos” não tinham qualquer efeito na adesão e invasão da estirpe de *A. butzleri*, nos ensaios de deslocamento e exclusão, já se observa o efeito dos “lactobacilos” na adesão de *A. butzleri*. A literatura refere que a inibição de adesão e invasão por parte dos probióticos pode dever-se a mais do que apenas a competição pelo local de adesão e invasão, sendo que estes resultados podem dever se a uma variedade de mecanismos utilizados pelos probióticos, inclusive estas espécies de “lactobacilos” na inibição de adesão e invasão de estirpes patogénicas. Destes mecanismos um exemplo é o uso de proteínas *S-layer* pelos “lactobacilos”, que estão envolvidas em exclusão e competição de estirpes patogénicas em células HeLa como demonstrado para *E. coli* e *Salmonella* Typhimurium na presença de *Lactobacillus crispatus* (Chen et al., 2007). Outro mecanismo que pode justificar estes resultados será a libertação de ácidos orgânicos, como o ácido láctico libertado por estes “lactobacilos”, que por Lin et al., (2009) foi demonstrado inibir a adesão de *Helicobacter pylori* em

células AGS epiteliais gástricas humanas (Lin et al., 2009), similarmente ao observado por Taha-Abdelaziz *et al.*, (2019) em *C. jejuni*. Campana *et al.*, (2012) demonstrou que a causa pela qual os “lactobacilos” podem inibir a adesão e invasão de bactérias patogênicas, poderá ser através de peptídeos antimicrobianos libertados pelos “lactobacilos”, neste caso referindo-se a *L. acidophilus*(Campana et al., 2012).

No geral, os resultados obtidos neste trabalho, ainda que muito interessantes, diferem dos descritos em outros estudos, que demonstraram que, em geral, os “lactobacilos” têm a capacidade de diminuir a adesão e invasão de outros agentes patogênicos quando em competição, por exemplo diminuindo estas capacidades em *C. jejuni* a células Caco-2, (Campana *et al.*, 2012; Peng *et al.*, 2018; Tabashsum *et al.*, 2018). Para além disso, os autores demonstraram que a regulação dos genes associados à virulência em *C. jejuni* por espécies de “lactobacilos” impacta a sua capacidade de sobrevivência, colonização e invasão (Taha-Abdelaziz *et al.*, 2019).

Assim, neste trabalho, e ao contrário do descrito na literatura, não parece existir qualquer efeito, tanto inibitório como potenciador, das estirpes de “lactobacilos” na estirpe de *A. butzleri* em estudo, quando em competição. No entanto, nos ensaios de deslocamento e exclusão, os resultados já estão mais em linha com o que está descrito em outros estudos, nomeadamente no estudo de Campana *et al.*, (2012), onde é demonstrada a capacidade de *L. acidophilus* reduzir a adesão e invasão de *C. jejuni* em células Caco-2 e onde também foram obtidos melhores resultados para os ensaios de deslocamento, o que está de acordo com os resultados obtidos neste trabalho (Campana *et al.*, 2012).

Capítulo 5 - Conclusão

Aliarcobacter butzleri é uma espécie pertencente ao género *Aliarcobacter*, pertencente à família *Arcobacteraceae*, é uma bactéria patogénica de Gram-negativo, que tem vindo a ser descrita como amplamente distribuída em diversos ambientes e hospedeiros. Esta bactéria está associada a doenças como diarreia grave, enterite e bacteremia. Sendo considerada um enteropatógeno, que deve atravessar o trato gastrointestinal para atingir o local de colonização, encontrando no percurso diversas barreiras como o pH, os sais biliares e probióticos. Considerando isto, neste trabalho pretendeu-se estudar o potencial efeito dos probióticos na sobrevivência e virulência de *A. butzleri*.

Assim, primeiramente foi avaliada a tolerância de *A. butzleri* e dos probióticos em estudo, a condições gastrointestinais, nomeadamente pH ácido e sais biliares. Nas estirpes de *A. butzleri* estudadas foi demonstrado dificuldade de crescimento a pH ácido, ao contrário do que foi demonstrado nas estirpes de “lactobacilos”, considerados probióticos, no qual todas apresentaram crescimento na gama de pH testada. Na avaliação da tolerância aos sais biliares, os resultados apresentados demonstram que *A. butzleri* apresenta resistência às concentrações fisiológicas de sais biliares encontradas no corpo humano, ao contrário das estirpes de “lactobacilos”, que apresentam menor resistência a estas concentrações. No geral, estes resultados sugerem que as estirpes de *A. butzleri* e “lactobacilos” em estudo são capazes de resistir ao percurso do trato gastrointestinal.

De seguida, foi efetuada uma avaliação do efeito do sobrenadante dos probióticos ou da cocultura no crescimento de *A. butzleri*, tendo sido demonstrado que a inibição do crescimento da estirpe de *A. butzleri* estudada pelo sobrenadantes livres de células das três estirpes probióticas é provavelmente devida à acidez. Esta acidez será causada pela libertação de compostos por parte destas estirpes, que por sua vez tornam o meio mais ácido, levando à redução do crescimento de *A. butzleri*. Quando foi analisado o crescimento de *A. butzleri* na presença de estirpes de “lactobacilos”, este estudo demonstrou que existe uma inibição de sobrevivência da estirpe de *A. butzleri* por parte das três estirpes probióticas, apesar de esta inibição ser dependente da espécie de lactobacilos, e variar consoante o meio de cultura usado.

No seguimento do estudo anterior foi também avaliado o efeito dos sobrenadantes dos probióticos na formação de biofilmes de *A. butzleri*, tendo-se demonstrado que o SLC de *L. plantarum* aparenta potenciar a formação de biofilme, enquanto o de *L. acidophilus*

não tem qualquer efeito na formação de biofilme de *A. butzleri*; por sua vez o SLC de *L. reuteri* aparenta inibir ligeiramente a formação de biofilme de *A. butzleri*.

O último objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito das estirpes probióticas na virulência de *A. butzleri*, mais concretamente na competição na adesão e invasão celular. Os resultados mostraram que nenhuma das três estirpes de “lactobacilos” tem qualquer efeito na adesão e invasão de *A. butzleri* em células Caco-2, quando em competição. Em contraste, foi observado que *A. butzleri* produziu um efeito de inibição na adesão de duas das estirpes probióticas, *L. acidophilus* e *L. plantarum* quando em competição, não tendo este resultado sido previamente descrito com outras bactérias enteropatogénicas. Nos ensaios de deslocamento e exclusão, os resultados demonstram uma capacidade de todas as estirpes de “lactobacilos” na diminuição da adesão da estirpe de *A. butzleri*, mas não tendo efeito na invasão desta. No entanto, o facto de ter sido estudada apenas uma estirpe de *A. butzleri*, não permite generalizar estes resultados.

Em suma, neste trabalho foi demonstrado que os probióticos poderão ter um importante papel em limitar o crescimento de *A. butzleri*, mas o seu potencial sobre a virulência desta bactéria ainda precisa de ser mais explorado.

Capítulo 6 - Perspetivas futuras

Tendo em consideração o potencial de estirpes de “lactobacilos” serem aplicadas como probióticos, a escassez de conhecimento acerca do seu papel sobre *A. butzleri*, e os resultados obtidos neste trabalho, sugerem a necessidade de mais estudos para aprofundar o conhecimento do efeito dos probióticos na virulência de *A. butzleri*, tais como:

- Alargar o número de estirpes de *A. butzleri* em estudo;
- Alargar o número de estirpes probióticas em estudo;
- Determinar a causa do efeito inibidor dos sobrenadantes de probióticos, nomeadamente dos “lactobacilos”.

Bibliografia

- Abbasiliasi, S., Tan, J. S., Tengku Ibrahim, T. A., Bashokouh, F., Ramakrishnan, N. R., Mustafa, S., & Ariff, A. B. (2017). Fermentation factors influencing the production of bacteriocins by lactic acid bacteria: a review. *RSC Advances*, 7(47), 29395–29420. <https://doi.org/10.1039/C6RA24579J>
- Adesiji, Y. O. (2010). Fecal shedding of *Arcobacter* species following experimental infection in rats: Public health implications. *Central European Journal of Medicine*, 5(4), 470–474. <https://doi.org/10.2478/s11536-009-0109-3>
- Akier Assanta, M., Roy, D., Lemay, M. E., & Montpetit, D. (2002). Attachment of *Arcobacter butzleri*, a New Waterborne Pathogen, to Water Distribution Pipe Surfaces. *Journal of Food Protection*, 65(8), 1240–1247. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.8.1240>
- Anjum, N., Maqsood, S., Masud, T., Ahmad, A., Sohail, A., & Momin, A. (2014). *Lactobacillus acidophilus*: Characterization of the Species and Application in Food Production. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(9), 1241–1251. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.621169>
- Atarashi, K., Tanoue, T., Ando, M., Kamada, N., Nagano, Y., Narushima, S., Suda, W., Imaoka, A., Setoyama, H., Nagamori, T., Ishikawa, E., Shima, T., Hara, T., Kado, S., Jinnohara, T., Ohno, H., Kondo, T., Toyooka, K., Watanabe, E., Yokoyama, S., Tokoro, S., Mori, H., Noguchi, Y., Morita, H., Ivanov, I. I., Sugiyama, T., Nuñez, G., Camp, J. G., Hattori, M., Umesaki, Y., and Honda, K. (2015). Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells. *Cell*, 163(2), 367–380. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.058>
- Babrud, B., Kermanshahi, K., Sede, M., & Moosavinejad, S. Z. (2019). The effect of *Lactobacillus reuteri* cell free supernatant on growth and biofilm formation of *Paenibacillus larvae*. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 20(3), 192–198. <https://doi.org/10.22099/ijvr.2019.5351>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Begley, M., Gahan, C. G. M., & Hill, C. (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews* 29(4), 625–651. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.09.003>

Behera, S. S., Ray, R. C., & Zdolec, N. (2018). *Lactobacillus plantarum* with Functional Properties: An Approach to Increase Safety and Shelf-Life of Fermented Foods. *BioMed Research International*, 2018, 9361614. <https://doi.org/10.1155/2018/9361614>

Bell, R. L., Kase, J. A., Harrison, L. M., Balan, K. V., Babu, U., Chen, Y., Macarisin, D., Kwon, H. J., Zheng, J., Stevens, E. L., Meng, J., & Brown, E. W. (2021). The persistence of bacterial pathogens in surface water and its impact on global food safety. *Pathogens*, 10(11), 1391. <https://doi.org/10.3390/pathogens10111391>

Bücker, R., Troeger, H., Kleer, J., Fromm, M., & Schulzke, J. D. (2009). *Arcobacter butzleri* induces barrier dysfunction in intestinal HT-29/B6 cells. *Journal of Infectious Diseases*, 200(5), 756–764. <https://doi.org/10.1086/600868>

Campana, R., Federici, S., Ciandrini, E., & Baffone, W. (2012). Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 on the growth and adhesion/invasion characteristics of Human *Campylobacter jejuni*. *Current Microbiology*, 64(4), 371–378. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0080-0>

Castiblanco, L. F., & Sundin, G. W. (2016). New insights on molecular regulation of biofilm formation in plant-associated bacteria. *Journal of Integrative Plant Biology*, 58(4), 362–372. <https://doi.org/10.1111/jipb.12428>

Çelik, C., Pınar, O., & Sipahi, N. (2022). The Prevalence of *Aliarcobacter* Species in the Fecal Microbiota of Farm Animals and Potential Effective Agents for Their Treatment: A Review of the Past Decade. *Microorganisms*, 10(12), 2430. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122430>

Chaves, M., Vazquez-Valverde, D., Fernández-Jaramillo, H., & Arias-Echandi, M. L. (2021). The ability of *Aliarcobacter butzleri* strains isolated from foods of animal origin in costa rica to form biofilm. *Italian Journal of Food Safety*, 10(2), 9020. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2021.9020>

Chen, X., Xu, J., Shuai, J., Chen, J., Zhang, Z., & Fang, W. (2007). The S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology*, 115(3), 307–312. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.11.007>

Chieffi, D., Fanelli, F., & Fusco, V. (2020). *Arcobacter butzleri*: Up-to-date taxonomy, ecology, and pathogenicity of an emerging pathogen. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(4), 2071–2109. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12577>

Collado, L., & Figueras, M. J. (2011). Taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus *Arcobacter*. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(1), 174–192. <https://doi.org/10.1128/CMR.00034-10>

Collado, L., Gutiérrez, M., González, M., & Fernández, H. (2013). Assessment of the prevalence and diversity of emergent campylobacteria in human stool samples using a

combination of traditional and molecular methods. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 75(4), 434–436. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.12.006>

Compare, D., Sgamato, C., Nardone, O. M., Rocco, A., Coccoli, P., Laurenza, C., & Nardone, G. (2022). Probiotics in Gastrointestinal Diseases: All that Glitters Is Not Gold. *Digestive Diseases* 40(1), 123–132. <https://doi.org/10.1159/000516023>

Costello, E. K., Lauber, C. L., Hamady, M., Fierer, N., Gordon, J. I., & Knight, R. (2009). Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*, 326(5960), 1694–1697. <https://doi.org/10.1126/science.1177486>

Danilova, A., Adzhieva, A. A., Danilina, G. A., Polyakov, N. B., Soloviev, A. I., & Zhukhovitsky, V. G. (2019). Antimicrobial Activity of Supernatant of *Lactobacillus plantarum* against Pathogenic Microorganisms. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 167(6), 751–754. <https://doi.org/10.1007/s10517-019-04615-9>

Dieterich, W., Schink, M., & Zopf, Y. (2018). Microbiota in the Gastrointestinal Tract. *Medical sciences*, 6(4), 116. <https://doi.org/10.3390/medsci6040116>

Ding, Q., Sun, X., Cao, S., Zhao, C., Wang, Y., & Wang, X. (2021). Heat-killed *Lactobacillus acidophilus* mediates *Fusobacterium nucleatum* induced pro-inflammatory responses in epithelial cells. *FEMS Microbiology Letters*, 368(5), fnaa160. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa160>

Donachie, S. P., Bowman, J. P., On, S. L. W., & Alam, M. (2005). *Arcobacter halophilus* sp. nov., the first obligate halophile in the genus *Arcobacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(3), 1271–1277. <https://doi.org/10.1099/ijs.o.63581-0>

Ellis, W. A., Neill, S. D., O'Brien, J. J., Ferguson, H. W., & Hanna, J. (1977). Isolation of Spirillum/Vibrio-like organisms from bovine fetuses. *The Veterinary Record*, 100(21), 451–452. <https://doi.org/10.1136/vr.100.21.451>

Fernandez-Cantos, M. V., Garcia-Morena, D., Iannone, V., El-Nezami, H., Kolehmainen, M., & Kuipers, O. P. (2021). Role of microbiota and related metabolites in gastrointestinal tract barrier function in NAFLD. *Tissue Barriers*, 9(3), e1879719. <https://doi.org/10.1080/21688370.2021.1879719>

Ferreira, S., Fraqueza, M. J., Queiroz, J. A., Domingues, F. C., & Oleastro, M. (2013). Genetic diversity, antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Arcobacter butzleri* isolated from poultry and environment from a Portuguese slaughterhouse. *International Journal of Food Microbiology*, 162(1), 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.003>

Ferreira, S., Júlio, C., Queiroz, J. A., Domingues, F. C., & Oleastro, M. (2014). Molecular diagnosis of *Arcobacter* and *Campylobacter* in diarrheal samples among Portuguese

patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 78(3), 220–225. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.11.021>

Ferreira, S., Oleastro, M., & Domingues, F. (2019). Current insights on *Arcobacter butzleri* in food chain. *Current Opinion in Food Science* 26, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.02.013>

Ferreira, S., Queiroz, J. A., Oleastro, M., & Domingues, F. C. (2016). Insights in the pathogenesis and resistance of *Arcobacter*: A review. *Critical Reviews in Microbiology* 42(3), 364–383. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.954523>

Flint, A., Butcher, J., & Stintzi, A. (2016). Stress Responses, Adaptation, and Virulence of Bacterial Pathogens During Host Gastrointestinal Colonization. *Microbiology Spectrum*, 4(2), 1128. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.vmbf-0007-2015>

FAO/WHO (2006) Probiotics in Food: Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, Cordoba, Argentina, 1-4 October 2001 [and] Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London, Ontario, Canada, 30 April-1 May 2002. FAO Food and Nutrition Paper 85, Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, Rome.

Gao, H., Li, X., Chen, X., Hai, D., Wei, C., Zhang, L., & Li, P. (2022). The Functional Roles of *Lactobacillus acidophilus* in Different Physiological and Pathological Processes. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(10), 1226–1233. <https://doi.org/10.4014/jmb.2205.05041>

Girbau, C., Martinez-Malaxetxebarria, I., Muruaga, G., Carmona, S., Alonso, R., & Fernandez-Astorga, A. (2017). Study of biofilm formation ability of foodborne *Arcobacter butzleri* under different conditions. *Journal of Food Protection*, 80(5), 758–762. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-505>

Goldstein, E. J. C., Tyrrell, K. L., & Citron, D. M. (2015). *Lactobacillus* species: Taxonomic complexity and controversial susceptibilities. *Clinical Infectious Diseases*, 60, S98–S107. <https://doi.org/10.1093/cid/civ072>

Gölz, G., Alter, T., Bereswill, S., & Heimesaat, M. M. (2016). The immunopathogenic potential of *Arcobacter butzleri* - Lessons from a meta-analysis of murine infection studies. *PLoS ONE*, 11(7), e0159685. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159685>

Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S., & Tribedi, P. (2016). Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. *Archives of Microbiology*, 198(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1148-6>

- Heeney, D. D., Gareau, M. G., & Marco, M. L. (2018). Intestinal *Lactobacillus* in health and disease, a driver or just along for the ride? *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.08.004>
- Ho, H. T. K., Lipman, L. J. A., Hendriks, H. G. C. J. M., Tooten, P. C. J., Ultee, T., & Gaastra, W. (2007). Interaction of *Arcobacter* spp. with human and porcine intestinal epithelial cells. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 50(1), 51–58. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00230.x>
- Holm, R., Møller, A., & Mu, H. (2013). Bile salts and their importance for drug absorption. *International Journal of Pharmaceutics*, 453(1), 44–55. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.04.003>
- Houf, K., On, S. L. W., Coenye, T., Mast, J., Van Hoof, J., & Vandamme, P. (2005). *Arcobacter cibarius* sp. nov., isolated from broiler carcasses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(2), 713–717. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63103-0>
- Houf, K., & Stephan, R. (2007). Isolation and characterization of the emerging foodborn pathogen *Arcobacter* from human stool. *Journal of Microbiological Methods*, 68(2), 408–413. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.09.020>
- Hsu, T. T. D., & Lee, J. (2015). Global Distribution and Prevalence of *Arcobacter* in Food and Water. *Zoonoses and Public Health*, 62(8), 579–589. <https://doi.org/10.1111/zph.12215>
- Hunt, R. H., Camilleri, M., Crowe, S. E., El-Omar, E. M., Fox, J. G., Kuipers, E. J., Malfertheiner, P., McColl, K. E. L., Pritchard, D. M., Rugge, M., Sonnenberg, A., Sugano, K., & Tack, J. (2015). The stomach in health and disease. *Gut*, 64(10), 1650–1668. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307595>
- Isohanni, P., Huehn, S., Aho, T., Alter, T., & Lyhs, U. (2013). Heat stress adaptation induces cross-protection against lethal acid stress conditions in *Arcobacter butzleri* but not in *Campylobacter jejuni*. *Food Microbiology*, 34(2), 431–435. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.02.001>
- Karadas, G., Sharbati, S., Hänel, I., Messelhäuser, U., Glocker, E., Alter, T., & Götz, G. (2013). Presence of virulence genes, adhesion and invasion of *Arcobacter butzleri*. *Journal of Applied Microbiology*, 115(2), 583–590. <https://doi.org/10.1111/jam.12245>
- Kerkhof, P. J., Van den Abeele, A. M., Strubbe, B., Vogelaers, D., Vandamme, P., & Houf, K. (2021). Diagnostic approach for detection and identification of emerging enteric pathogens revisited: the *(Ali)arcobacter lanthieri* case. *New Microbes and New Infections*, 39, 100829. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2020.100829>
- Kim, S. K., Guevarra, R. B., Kim, Y. T., Kwon, J., Kim, H., Cho, J. H., Kim, H. B., & Lee, J. H. (2019). Role of probiotics in human gut microbiome-associated diseases. *Journal*

- of *Microbiology and Biotechnology*, 29(9), 1335–1340.
<https://doi.org/10.4014/jmb.1906.06064>
- Kjeldgaard, J., Jørgensen, K., & Ingmer, H. (2009). Growth and survival at chiller temperatures of *Arcobacter butzleri*. *International Journal of Food Microbiology*, 131(2–3), 256–259. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.017>
- Kohl, K. D., Stengel, A., Samuni-Blank, M., & Dearing, M. D. (2013). Effects of Anatomy and Diet on Gastrointestinal pH in Rodents. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 319(4), 225–229. <https://doi.org/10.1002/jez.1786>
- Kos, B., Susković, J., Vuković, S., Simpraga, M., Frece, J., Matosić, S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, 94(6), 981–987. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01915.x>.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. J. (2008). Genes and Molecules of *Lactobacilli* Supporting Probiotic Action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(4), 728–764. <https://doi.org/10.1128/membr.00017-08>
- Levican, A., Alkeskas, A., Günter, C., Forsythe, S. J., & Figueras, M. J. (2013). Adherence to and invasion of human intestinal cells by *Arcobacter* species and their virulence genotypes. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(16), 4951–4957. <https://doi.org/10.1128/AEM.01073-13>
- Lievin, V. (2000). *Bifidobacterium* strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut*, 47(5), 646–652. <https://doi.org/10.1136/gut.47.5.646>
- Lim, S.-M. (2010). Cultural conditions and nutritional components affecting the growth and bacteriocin production of *Lactobacillus plantarum* KC21. *Food Science and Biotechnology*, 19(3), 793–802. <https://doi.org/10.1007/s10068-010-0111-1>
- Lin, W., Lin, C., Sheu, S., Hwang, C., Ye, W., Hwang, W., & Tsen, H. (2009). Antagonistic Activity of Spent Culture Supernatants of Lactic Acid Bacteria against *Helicobacter pylori* Growth and Infection in Human Gastric Epithelial AGS Cells. *Journal of Food Science*, 74(6) 225–230. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01194.x>
- Liu, Y. W., Liong, M. T., & Tsai, Y. C. (2018). New perspectives of *Lactobacillus plantarum* as a probiotic: The gut-heart-brain axis. *Journal of Microbiology*, 56(9), 601–613. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-8079-2>
- Lohse, M. B., Gulati, M., Johnson, A. D., & Nobile, C. J. (2018). Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 16(1), 19–31. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.107>

- Manuel, R., & Martins, M. (2021). Pathogenic potential of human isolates of *Aliarcobacter butzleri*. [Tese de Mestrado, Universidade da Beira Interior] <http://hdl.handle.net/10400.6/11485>
- Martinez-Malaxetxebarria, I., Girbau, C., Salazar-Sánchez, A., Baztarrika, I., Martínez-Ballesteros, I., Laorden, L., Alonso, R., & Fernández-Astorga, A. (2022). Genetic characterization and biofilm formation of potentially pathogenic foodborne *Arcobacter* isolates. *International Journal of Food Microbiology*, 373, 109712. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109712>
- Martins, R., Mateus, C., Domingues, F., Bücken, R., Oleastro, M., & Ferreira, S. (2022). Effect of Atmospheric Conditions on Pathogenic Phenotypes of *Arcobacter butzleri*. *Microorganisms*, 10(12), 2409. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122409>
- Mateus, C., Maia, C. J., Domingues, F., Bücken, R., Oleastro, M., & Ferreira, S. (2023). Evaluation of Bile Salts on the Survival and Modulation of Virulence of *Aliarcobacter butzleri*. *Antibiotics*, 12(9), 1387. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12091387>
- Mateus, C., Martins, R., Luís, Â., Oleastro, M., Domingues, F., Pereira, L., & Ferreira, S. (2021). Prevalence of *Arcobacter*: From farm to retail – A systematic review and meta-analysis. *Food Control*, 128, 108177. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108177>
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). (Eds.). (2018). Microorganisms in food 7 - Microbiological testing in food safety management. *Internacional Commission on Microbiological Specifications for Foods*, Springer Science & Business Media. Second Edition. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-68460-4>
- Mu, Q., Tavella, V. J., & Luo, X. M. (2018). Role of *Lactobacillus reuteri* in human health and diseases. *Frontiers in Microbiology*, 9, 757. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00757>
- O’Callaghan, J., & O’Toole, P. W. (2013). *Lactobacillus*: Host-microbe relationships. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 358, 119–154. https://doi.org/10.1007/82_2011_187
- Oliveira, M. G. X. de, Cunha, M. P. V., Moreno, L. Z., Saidenberg, A. B. S., Vieira, M. A. M., Gomes, T. A. T., Moreno, A. M., & Knöbl, T. (2023). Antimicrobial Resistance and Pathogenicity of *Aliarcobacter butzleri* Isolated from Poultry Meat. *Antibiotics*, 12(2) 282. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020282>
- On, S. L., Stacey, A., & Smyth, J. (1995). Isolation of *Arcobacter butzleri* from a neonate with bacteraemia. *The Journal of Infection*, 31(3), 225–227. [https://doi.org/10.1016/s0163-4453\(95\)80031-x](https://doi.org/10.1016/s0163-4453(95)80031-x)

- Oren, A., & Garrity, G. M. (2018). List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(11), 3379–3393. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003071>
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T.-J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, 37(1), 177–192. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>
- Peng, M., Reichmann, G., & Biswas, D. (2015). *Lactobacillus casei* and its byproducts alter the virulence factors of foodborne bacterial pathogens. *Journal of Functional Foods*, 15, 418–428. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.03.055>
- Peng, M., Tabashsum, Z., Patel, P., Bernhardt, C., & Biswas, D. (2018). Linoleic acids overproducing *Lactobacillus casei* limits growth, survival, and virulence of *Salmonella typhimurium* and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2663. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02663>
- Pérez-Cataluña, A., Salas-Massó, N., Diéguez, A. L., Balboa, S., Lema, A., Romalde, J. L., & Figueras, M. J. (2018). Revisiting the Taxonomy of the Genus *Arcobacter*: Getting Order From the Chaos. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2077. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02077>
- Pérez-Cataluña A, Salas-Massó N, Diéguez AL, Balboa S, Lema A, Romalde JL and Figueras MJ (2019) Corrigendum (2): Revisiting the Taxonomy of the Genus *Arcobacter*: Getting Order From the Chaos. *Front. Microbiol.* 10, 2253. doi: 10.3389/fmicb.2019.02253
- Piccioni, A., Franza, L., Vaccaro, V., Saviano, A., Zanza, C., Candelli, M., Covino, M., Franceschi, F., & Ojetti, V. (2021). Microbiota and probiotics: The role of *Limosilactobacillus reuteri* in diverticulitis. *Medicina*, 57(8), 802. <https://doi.org/10.3390/medicina57080802>
- Pizarro-Cerdá, J., & Cossart, P. (2006). Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell*, 124(4), 715–727. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.012>
- Rather, M. A., Gupta, K., & Mandal, M. (2021). Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(4), 1701–1718. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00624-x>
- Reed, K. K., & Wickham, R. (2009). Review of the Gastrointestinal Tract: From Macro to Micro. *Seminars in Oncology Nursing*, 25(1), 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2008.10.002>
- Salazar-Sánchez, A., Baztarrika, I., Alonso, R., Fernández-Astorga, A., Martínez-Ballesteros, I., & Martínez-Malaxetxebarria, I. (2022). *Arcobacter butzleri* Biofilms:

- Insights into the Genes Beneath Their Formation. *Microorganisms*, 10(7), 1280. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071280>
- Samuels, J. X. (2009). Cranial morphology and dietary habits of rodents. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 156(4), 864–888. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2009.00502.x>
- Sánchez, B., Delgado, S., Blanco-Míguez, A., Lourenço, A., Gueimonde, M., & Margolles, A. (2017). Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Molecular Nutrition and Food Research*, 61(1), 1600240. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600240>
- Sasi Jyothsna, T. S., Rahul, K., Ramaprasad, E. V. V., Sasikala, C., & Ramana, C. V. (2013). *Arcobacter anaerophilus* sp. nov., isolated from an estuarine sediment and emended description of the genus *Arcobacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(12), 4619–4625. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.054155-0>
- Saviano, A., Brigida, M., Migneco, A., Gunawardena, G., Zanza, C., Candelli, M., Franceschi, F., & Ojetti, V. (2021). *Lactobacillus reuteri* dsm 17938 (*Limosilactobacillus reuteri*) in diarrhea and constipation: Two sides of the same coin? *Medicina* 57(7), 643. <https://doi.org/10.3390/medicina57070643>
- Scillato, M., Spitale, A., Mongelli, G., Privitera, G. F., Mangano, K., Cianci, A., Stefani, S., & Santagati, M. (2021). Antimicrobial properties of *Lactobacillus* cell-free supernatants against multidrug-resistant urogenital pathogens. *MicrobiologyOpen*, 10(2), 1173. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1173>
- Seddik, H. A., Bendali, F., Gancel, F., Fliss, I., Spano, G., & Drider, D. (2017). *Lactobacillus plantarum* and Its Probiotic and Food Potentialities. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 9(2), 111–122. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9264-z>
- Shange, N., Gouws, P., & Hoffman, L. C. (2019). *Campylobacter* and *Arcobacter* species in food-producing animals: prevalence at primary production and during slaughter. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(9), 146. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2722-x>
- Sidooski, T., Brandelli, A., Bertoli, S. L., Souza, C. K. de, & Carvalho, L. F. de. (2019). Physical and nutritional conditions for optimized production of bacteriocins by lactic acid bacteria – A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(17), 2839–2849. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1474852>
- Simaluiza, R. J., Ambuludi, D. R., & Fernández, H. (2021). First case of diarrhea due to *Aliarcobacter butzleri* (formerly *Arcobacter butzleri*) in Ecuador. *Infectious Diseases Now*, 51(6), 564–566. <https://doi.org/10.1016/j.idnow.2020.12.002>

- Singhal, N., Singh, N. S., Mohanty, S., Kumar, M., & Viridi, J. S. (2021). Rhizospheric *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) strains exhibit bile salt hydrolysis, hypocholestrolemic and probiotic capabilities in vitro. *Scientific Reports*, 11(1), 15288. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94776-3>
- Suez, J., Zmora, N., Segal, E., & Elinav, E. (2019). The pros, cons, and many unknowns of probiotics. *Nature Medicine* 25(5), 716–729. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0439-x>
- Tabashsum, Z., Peng, M., Salaheen, S., Comis, C., & Biswas, D. (2018). Competitive elimination and virulence property alteration of *Campylobacter jejuni* by genetically engineered *Lactobacillus casei*. *Food Control*, 85, 283–291. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.10.010>
- Taha-Abdelaziz, K., Astill, J., Kulkarni, R. R., Read, L. R., Najarian, A., Farber, J. M., & Sharif, S. (2019). In vitro assessment of immunomodulatory and anti-*Campylobacter* activities of probiotic lactobacilli. *Scientific Reports*, 9(1), 17903. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54494-3>
- Tannock, G. W. (2002). The *Bifidobacterial* and *Lactobacillus* Microflora of Humans A Plethora of Prokaryotes. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* 22(3), 231-253. <https://doi: 10.1007/s12016-002-0010-1>
- Thaiss, C. A., Levy, M., Korem, T., Dohnalová, L., Shapiro, H., Jaitin, D. A., David, E., Winter, D. R., Gury-BenAri, M., Tatirovsky, E., Tuganbaev, T., Federici, S., Zmora, N., Zeevi, D., Dori-Bachash, M., Pevsner-Fischer, M., Kartvelishvily, E., Brandis, A., Harmelin, A., Shibolet, O., Halpern, Z., Honda, K., Amit, I., Segal, E., and Elinav, E. (2016). Microbiota Diurnal Rhythmicity Programs Host Transcriptome Oscillations. *Cell*, 167(6), 1495-1510.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.003>
- Tuo, Y., Yu, H., Ai, L., Wu, Z., Guo, B., & Chen, W. (2013). Aggregation and adhesion properties of 22 *Lactobacillus* strains. *Journal of Dairy Science*, 96(7), 4252–4257. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6547>
- Tuomola, E. M., & Salminen, S. J. (1998). Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *International Journal of Food Microbiology* 41(1), 45-51. [https://doi: 10.1016/s0168-1605\(98\)00033-6](https://doi: 10.1016/s0168-1605(98)00033-6).
- Valeriano, V. D. V., Balolong, M. P., & Kang, D. K. (2017). Probiotic roles of *Lactobacillus* sp. in swine: insights from gut microbiota. *Journal of Applied Microbiology* 122(3), 554–567. <https://doi.org/10.1111/jam.13364>
- Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R., & De Ley, J. (1991). Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41(1), 88–103. <https://doi.org/10.1099/00207713-41-1-88>

- Vandamme, P., Pugina, P., Benzi, G., Van Etterijck, R., Vlaes, L., Kersters, K., Butzler, J. P., Lior, H., & Lauwers, S. (1992). Outbreak of recurrent abdominal cramps associated with *Arcobacter butzleri* in an Italian school. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(9), 2335–2337. <https://doi.org/10.1128/jcm.30.9.2335-2337.1992>
- Vandamme, P., Vancanneyt, M., Pot, B., Mels, L., Hoste, B., Dewettinck, D., Vlaes, L., van den Borre, C., Higgins, R., & Hommez, J. (1992). Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42(3), 344–356. <https://doi.org/10.1099/00207713-42-3-344>
- Venâncio, I., Luís, Â., Domingues, F., Oleastro, M., Pereira, L., & Ferreira, S. (2022). The Prevalence of *Arcobacteraceae* in Aquatic Environments: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Pathogens*, 11(2), 244. <https://doi.org/10.3390/pathogens11020244>
- Waite, D. W., Vanwonterghem, I., Rinke, C., Parks, D. H., Zhang, Y., Takai, K., Sievert, S. M., Simon, J., Campbell, B. J., Hanson, T. E., Woyke, T., Klotz, M. G., & Hugenholtz, P. (2017). Comparative genomic analysis of the class *Epsilonproteobacteria* and proposed reclassification to *Epsilonbacteraeota* (phyl. nov.). *Frontiers in Microbiology*, 8(8), 682. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00682>
- Wang, G., Zhao, Y., Tian, F., Jin, X., Chen, H., Liu, X., Zhang, Q., Zhao, J., Chen, Y., Zhang, H., & Chen, W. (2014). Screening of adhesive lactobacilli with antagonistic activity against *Campylobacter jejuni*. *Food Control*, 44, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.042>
- Wang, G., & Zeng, H. (2022). Antibacterial Effect of Cell-Free Supernatant from *Lactobacillus pentosus* L-36 against *Staphylococcus aureus* from Bovine Mastitis. *Molecules*, 27(21), 7627. <https://doi.org/10.3390/molecules27217627>
- White, A. E., Tillman, A. R., Hedberg, C., Bruce, B. B., Batz, M., Seys, S. A., Dewey-Mattia, D., Bazaco, M. C., & Walter, E. S. (2022). Foodborne Illness Outbreaks Reported to National Surveillance, United States, 2009–2018. *Emerging Infectious Diseases*, 28(6), 1117–1127. <https://doi.org/10.3201/eid2806.211555>
- Wilkins, T., Sequoia, J., Jennings, W., & Dorn, B. (2017). Probiotics for Gastrointestinal Conditions: A Summary of the Evidence. *American Family Physician*, 96(3), 170-178. PMID: 28762696.
- Williams, N. T. (2010). Probiotics. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 67(6), 449–458. <https://doi.org/10.2146/ajhp090168>
- Yang, J., Qian, K., Wang, C., & Wu, Y. (2018). Roles of Probiotic *Lactobacilli* Inclusion in Helping Piglets Establish Healthy Intestinal Inter-environment for Pathogen Defense.

Probiotics and Antimicrobial Proteins 10(2), 243–250.
<https://doi.org/10.1007/s12602-017-9273-y>

Zamani, H., Rahbar, S., Garakoui, S. R., Sahebi, A. A., & Jafari, H. (2017). Antibiofilm potential of *Lactobacillus plantarum* spp. cell free supernatant (CFS) against multidrug resistant bacterial pathogens. *Pharmaceutical and Biomedical Research* 3(2), 39-44.
<http://pbr.mazums.ac.ir/article-1-167-en.html>

Zhang, C., Derrien, M., Levenez, F., Brazeilles, R., Ballal, S. A., Kim, J., Degivry, M.-C., Quéré, G., Garault, P., van Hylckama Vlieg, J. E. T., Garrett, W. S., Doré, J., & Veiga, P. (2016). Ecological robustness of the gut microbiota in response to ingestion of transient food-borne microbes. *The ISME Journal*, 10(9), 2235–2245.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2016.13>

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O’toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus beijerinck* 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782–2858.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>