

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

PALOMA CAVALCANTE CUNHA

**PROPOSIÇÃO DE UM COQUETEL FÁGICO PARA CONTROLE DE BIOFILMES
DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO EM AMBIENTES RELACIONADOS
À INDÚSTRIA DE ÓLEO E GÁS**

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2021**

PALOMA CAVALCANTE CUNHA

**PROPOSIÇÃO DE UM COQUETEL FÁGICO PARA CONTROLE DE BIOFILMES
DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO EM AMBIENTES RELACIONADOS
À INDÚSTRIA DE ÓLEO E GÁS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Roberto Sousa Dias

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

C972p
2021
Cunha, Paloma Cavalcante, 1996-
Proposição de um coquetel fágico para controle de biofilme de bactérias redutoras de sulfato em ambientes relacionados à indústria do óleo e gás / Paloma Cavalcante Cunha. – Viçosa, MG, 2021.

1 dissertação eletrônica (80 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Roberto Sousa Dias.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Geral, 2021.

Referências bibliográficas: f. 68-80.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2021.170>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Bacteriófagos. 2. Biofilmes - Controle biológico.
3. Bactérias redutoras de sulfato. I. Dias, Roberto Sousa, 1983-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. III. Título.

CDD 22. ed. 579.26

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto CRB6 2523

PALOMA CAVALCANTE CUNHA

**PROPOSIÇÃO DE UM COQUETEL FÁGICO PARA CONTROLE DE BIOFILMES
DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO EM AMBIENTES RELACIONADOS
À INDÚSTRIA DE ÓLEO E GÁS**

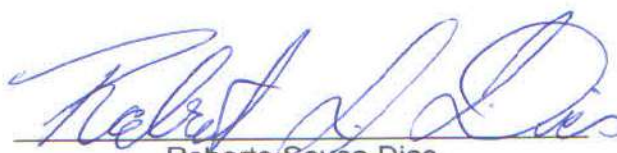
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 27 de julho de 2021

Assentimento:



Paloma Cavalcante Cunha
Autora



Roberto Sousa Dias
Orientador

Dedico esse trabalho à minha família, especialmente a minha avó que sempre acreditou na educação como ferramenta de transformação do mundo. Dedico-o ainda ao sistema público de educação do Brasil e aos professores, estudantes e lideranças políticas que lutam por ele.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente às forças superiores que me guiam. Agradeço também à minha mãe querida, guerreira, por me dar a vida e estar sempre ao meu lado, me apoiando e dando amor.

Ao meu orientador Roberto, por todos os ensinamentos e puxões de orelha, e por estar sempre de prontidão para me ajudar com qualquer coisa.

Ao professor Sérgio por me receber de braços abertos em seu laboratório e me dar todo apoio estrutural e orientações necessárias para o desenvolvimento deste trabalho.

A Bruna, pela colaboração importantíssima, pelos ensinamentos, e pela prontidão em ouvir e aconselhar.

Um agradecimento mais que especial aos meus amigos e colegas de trabalho, por me receberem com todo carinho no laboratório, pelos ensinamentos, por toda ajuda na execução dos experimentos, e por tornarem meus dias de trabalho mais alegres.

Agradeço também as minhas amigas e colegas de casa, Marília e Juliana, que se tornaram parte da família e dividiram comigo momentos bons e ruins, as preocupações do trabalho, me apoiando e sendo tão compreensivas nos momentos de angústia e estresse.

À banca, Sérgio, Monique, Leandro e Bruna, por aceitarem o convite de avaliar o meu trabalho.

À PETROBRAS, que financia e dá suporte às pesquisas com bacteriófagos no laboratório.

Por fim, agradeço a CAPES, pelo financiamento da bolsa, e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, pelo suporte ao desenvolvimento desse trabalho.

RESUMO

CUNHA, Paloma Cavalcante, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2021.
Proposição de um coquetel fágico para controle de biofilmes de bactérias redutoras de sulfato em ambientes relacionados à indústria de óleo e gás.
Orientador: Roberto Sousa Dias.

Na indústria petrolífera, os biofilmes formados por Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) causam grandes danos relacionados à corrosão de tanques e tubulações, além da produção de gases tóxicos como o H₂S. Os biocidas químicos, atualmente mais utilizados para o controle desses microrganismos, são frequentemente ineficazes contra biofilmes. Assim, os bacteriófagos (ou fagos) tem sido estudado como agentes alternativos de tratamento. Fagos são vírus que infectam bactérias e podem degradar substâncias poliméricas na matriz do biofilme, expondo as bactérias à infecção por novas partículas virais ou à estresses físicos e químicos. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo formular coquetéis de fagos e avaliar seu potencial no controle do biofilme formado por uma cultura mista de BRS de composição desconhecida. Para isso, 10 fagos foram isolados de amostras de esgoto e analisados por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Bactérias de crescimento rápido foram então usadas para triar os fagos isolados quanto ao potencial para reduzir a formação de biofilme e para avaliar o espectro de hospedeiro. O espectro do hospedeiro foi investigado pela análise da curva de crescimento de cada bactéria e o potencial para reduzir a formação de biofilme foi investigado pela quantificação da biomassa do biofilme. Como todos os fagos mostraram-se promissores no controle desses biofilmes, todos foram testados separadamente contra a cultura de BRS. A partir dos resultados obtidos com os fagos testados separadamente, 6 coquetéis foram formulados pela combinação dos isolados, que foram então testados para o controle da formação de biofilme pela cultura de BRS. Os fagos dos coquetéis também foram analisados quanto à estabilidade após incubação em diferentes condições de temperatura e pH, bem como em água do mar. A análise microscópica revelou a presença de 4 miovírus, 3 sifovírus e 3 podovírus. Três desses isolados foram capazes de infectar mais de um gênero bacteriano, sendo, portanto, fagos polivalentes. Todos os fagos foram capazes de, separadamente, reduzir a formação de biofilme de pelo

menos uma espécie bacteriana não hospedeira, e 5 foram capazes de reduzir a formação de biofilme pela cultura de BRS. Três dos seis coquetéis testados, Coq3, Coq5 e Coq6, reduziram a formação de biofilme pela cultura de BRS em 15%, 44% e 43%, respectivamente. Embora Coq5 tenha mostrado a maior porcentagem de redução (embora com pouca diferença de Coq6), Coq6 foi o mais promissor, uma vez que esses fagos tiveram melhor estabilidade nas diferentes condições estudadas em comparação com os fagos do Coq5. Todos os fagos do Coq6 permaneceram completamente estáveis quando incubados em água do mar e apresentaram viabilidade acima de 50% quando incubados em pH 4, características interessantes para uma aplicação de campo na indústria petrolífera onde baixos valores de pH e alta salinidade podem ser alcançados. Análises futuras de sequenciamento de genoma dos fagos e a identificação das espécies que compõem a cultura de BRS, bem como análise dos componentes do biofilme, devem ser realizadas para obter uma melhor compreensão das relações fago-biofilme. Em conclusão, a abordagem para seleção de coquetéis parece ser uma estratégia promissora.

Palavras-chave: Bacteriófagos. Biocontrole. Fagos polivalentes.

ABSTRACT

CUNHA, Paloma Cavalcante, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2021. **Proposal of a phage cocktail to control sulfate-reducing bacteria biofilms in environments related to the oil and gas industry.** Adviser: Roberto Sousa Dias.

In the oil industry, biofilms formed by Sulfate Reducing Bacteria (SRB) cause great damage related to corrosion of tanks and pipes, in addition to the production of toxic gases such as H₂S. Chemical biocides, currently most used to control these microorganisms, are often ineffective against biofilms. Thus, bacteriophages (or phages) have been studied as alternative treatment agents. Phages are viruses that infect bacteria and can degrade polymeric substances in the biofilm matrix, exposing the bacteria to infection by new viral particles or physical and chemical stresses. In this context, the present work aimed to formulate phage cocktails and evaluate their potential to control the biofilm formed by an SRB mixed culture of unknown composition. For this, 10 phages were isolated from sewage samples and analyzed by transmission electron microscopy (TEM). Fast-growing bacteria were then used to screen the isolated phages for their potential to reduce biofilm formation and to assess their host spectrum. The host spectrum was investigated by analyzing the growth curve of each bacteria and the potential to reduce biofilm formation was investigated by quantifying the biofilm biomass. As all phages showed promise in controlling these biofilms, they were all tested separately against the SRB culture. From the results obtained with the phages tested separately, 6 cocktails were formulated by combining the isolates, which were then tested to control biofilm formation by the SRB culture. The cocktail phages were also analyzed for stability after incubation under different conditions of temperature and pH, as well as in seawater. Microscopic analysis revealed the presence of 4 myoviruses, 3 siphoviruses and 3 podoviruses. Three of these isolates were able to infect more than one bacterial genus, being, therefore, polyvalent phages. All phages were able to, separately, reduce biofilm formation of at least one non-host bacterial species, and 5 were able to reduce biofilm formation by SRB culture. Three of the six cocktails tested, Coq3, Coq5 and Coq6, reduced biofilm formation by BRS culture by 15%, 44% and 43%, respectively. Although Coq5 showed the highest percentage reduction (albeit with little difference from Coq6), Coq6 was the

most promising, as these phages had better stability under the different conditions studied compared to Coq5 phages. All Coq6 phages remained completely stable when incubated in seawater and showed viability above 50% when incubated at pH 4, interesting characteristics for a field application in the oil industry where low pH values and high salinity can be achieved. Future analysis of phage genome sequencing and identification of species that make up the BRS culture, as well as analysis of biofilm components, should be performed to gain a better understanding of phage-biofilm relationships. In conclusion, the cocktail selection approach seems to be a promising strategy.

Keywords: Bacteriophages. Biocontrol. Polyvalent phages.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Descoberta dos bacteriófagos e surgimento da fagoterapia	14
2.2 Bacteriófagos: definição e classificação.....	18
2.3 Mecanismos e ciclos de infecção dos bacteriófagos.....	20
2.4 Bacteriófagos no controle de biofilmes bacterianos	23
2.5 Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) e uso de fagos para controle do biofilme.....	27
3. OBJETIVOS.....	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 Cepas bacterianas e condições de cultivo	33
4.2 Isolamentos dos fagos	33
4.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	34
4.4 Espectro de hospedeiro	35
4.5 Quantificação da biomassa total do biofilme formado por bactérias aeróbias	35
4.6 Ação dos bacteriófagos isolados e em coquetéis sobre a formação de biofilme por uma cultura mista de bactérias redutoras de sulfato	36
4.7 Formulação dos coquetéis fágicos	36
4.8 Testes de estabilidade	37
4.9 Análises estatísticas	38
4.10 Construção de um bacteriófago GFP recombinante	38
4.10.1 Construção do plasmídeo.....	38
4.10.2 Transformação da bactéria.....	39
4.10.3 Recombinação homóloga e propagação do fago recombinante.....	40
5. RESULTADOS	42
5.1 Isolamentos dos bacteriófagos.....	42
5.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	42
5.3 Espectro de hospedeiro	43
5.4 Quantificação da biomassa total do biofilme formado por bactérias aeróbias	50
5.5 Ação dos bacteriófagos isolados e em coquetéis sobre a formação de biofilme por uma cultura mista de bactérias redutoras de sulfato	52

5.6	Testes de estabilidade	53
5.7	Construção de um bacteriófago GFP recombinante	57
6.	DISCUSSÃO.....	60
7.	CONCLUSÕES.....	67
	REFERÊNCIAS.....	68

1. INTRODUÇÃO

Bacteriófagos, também conhecidos como fagos, são vírus que infectam bactérias e são as entidades biológicas mais abundantes e diversas do planeta (CLOKIE *et al.*, 2011); WHITMAN *et al.*, 1998). Por serem agentes responsáveis pela mortalidade de seus hospedeiros e pela transferência horizontal de genes os fagos desempenham um importante papel na evolução, diversificação e composição das comunidades bacterianas (MARTINY *et al.*, 2014; KOSKELLA e BROCKHURST, 2014). Desde que foram descobertos por Frederick Twort e Félix d'Hérelle no início do século XX, os fagos têm sido reconhecidos pelo seu potencial como agentes antimicrobianos (D'HÉRELLE F, 1917; TWORT, 1961; DIAS *et al.*, 2013). No entanto, a chegada dos antibióticos durante a Segunda Guerra Mundial e sua emergência como um tratamento barato e eficaz, aliado com a falta de estudos controlados e pouco conhecimento a respeito da biologia básica dos fagos, fez com que a terapia fágica caísse no esquecimento (DIAS *et al.*, 2013; HENEIN, 2013).

Nos últimos anos o surgimento das bactérias multidrogas resistentes e a decrescente taxa de descoberta de novos antibióticos fez crescer o interesse nas aplicações antimicrobianas dos fagos (LIN *et al.*, 2017; KUTATELADZE e ADAMIA). Os fagos são, na maioria dos casos, altamente específicos para um grupo de bactérias, permitindo a remoção de bactérias patogênicas e a sobrevivência de bactérias desejadas, diferentemente dos antibióticos que eliminam indiscriminadamente vários tipos de microrganismos (DIAS *et al.*, 2013; Loc-Carrillo e Abedon, 2011). Quando a especificidade dos fagos se torna um problema, coquetéis fágicos podem ser usados para aumentar o espectro de ação do produto final (DIAS *et al.*, 2013; LOC-CARRILLO e ABEDON, 2011). A aplicação de fagos pode reduzir o uso de agentes antimicrobianos e limitar a liberação de bactérias resistentes a antibióticos no ambiente (VIAZIS *et al.*, 2011; SPRICIGO *et al.*, 2013, GOLDMAN *et al.*, 2009; MILHO *et al.*, 2019) Além disso, a capacidade dos fagos de se autorreplicarem e de se readaptarem sobre pressão seletiva, aliado a um processo de produção simples, rápido e de baixo custo, tornam os fagos promissores agentes de controle microbiológico (DIAS *et al.*, 2013; Loc-Carrillo e Abedon, 2011). Os fagos podem ser usados não apenas para tratar infecções humanas, mas também para detectar patógenos, avaliar a segurança alimentar e controlar biofilmes (DIAS *et al.*, 2013; SCHMELCHER e LOESSNER, 2014; SPRICIGO *et al.*, 2013).

Biofilmes são comunidades microbianas que se desenvolvem aderidas a uma superfície, onde diferentes espécies vivem integradas e cercadas por uma complexa matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) (STOODLEY, 2002). Essas substâncias são principalmente polissacarídeos, proteínas, lipídeos e DNA, no entanto a composição exata do biofilme depende de vários fatores como espécies de microrganismos presente, tipo e quantidade de nutrientes disponíveis e material da superfície de adesão (STOODLEY, 2002; SEVIOUR *et al.*, 2018). Por se tratar de comunidades complexas e de natureza pouco penetrável os biofilmes são tolerantes a diversos agentes antimicrobianos e desinfetantes (ABEE *et al.*, 2011; STEWART e COSTERTON, 2001). Isso torna sua eliminação muito difícil, sendo um grande problema em ambientes hospitalares e industriais, onde esses biofilmes podem obstruir capilaridades, promover corrosão, liberar células aderidas causando recontaminação do ambiente, entre outros (DIAS *et al.*, 2013). Além disso, a aplicação de altas concentrações de antimicrobianos e um tempo prolongado de tratamento acaba gerando resíduos químicos nocivos ao ambiente e indução de resistência na comunidade microbiana (DIAS *et al.*, 2013; ABEE *et al.*, 2011).

Os bacteriófagos têm a capacidade de degradar o biofilme através de enzimas como as depolimerases, enzimas difusíveis que reduzem os níveis de polímeros de superfície como exopolissacarídeos e lipopolissacarídeos (LPS) (ROACH e DONOVAN, 2015). Em vez de lisar as células, a remoção de polissacarídeos pode desarranjar os componentes da matriz do biofilme, expondo as células bacterianas à infecção por novas partículas fágicas e a estresses físicos (p. ex, dessecação) e químicos (p. ex, antibióticos) (LU e COLLINS, 2007; BAKER *et al.*, 2002; BHATTACHARJEE *et al.*, 2015). Além disso, por causa da ação inespecífica dessas enzimas, é possível isolar um fago de uma espécie de fácil cultivo e utilizá-lo no controle do biofilme de outra espécie de crescimento e cultivo mais fastidiosos (K CHAN e T ABEDON, 2015; MACIEJEWSKA *et al.*, 2018).

Na indústria petrolífera, um grupo de microrganismos é especialmente problemático por causar grandes prejuízos relacionados à corrosão microbiologicamente influenciada (MIC) de tanques e tubulações, produção de gases tóxicos (H₂S) e diminuição da qualidade do petróleo (*souring*) (DE ALMEIDA *et al.*, 2009). Esse grupo é constituído por Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS), procariotos estritamente aneróbios e taxonomicamente diversos, que realizam a redução dissimilatória de compostos de enxofre em sulfeto (CASTRO *et al.*, 2000). Como a

MIC está comumente relacionada aos biofilmes formados pelas BRS, sua mitigação é justamente sobre o controle desses biofilmes (JIA *et al.*, 2019). Dessa forma, o uso de bacteriófagos para eliminação desses biofilmes tem sido estudado como uma alternativa promissora (BALDWIN e SUMMER, 2012).

É nesse contexto do desenvolvimento de estratégias para o controle de biofilmes associados à indústria petrolífera que o presente trabalho tem foco. A Petrobras é uma empresa brasileira que opera nas áreas de exploração, produção, refino, comercialização e transporte de petróleo, gás natural e seus derivados (PETROBRAS, 2021). A presença das BRS nas plataformas de exploração e produção de petróleo é uma das principais causas de corrosão em linhas e equipamentos da empresa (DE ALMEIDA *et al.*, 2009). A BRS47 é uma cultura mista isolada de uma plataforma desativada na Petrobras e está associada a problemas de corrosão e produção de H₂S em tanques de armazenamento. Nosso grupo de pesquisa tem trabalhado fortemente no isolamento de bacteriófagos líticos para espécies de BRS, a partir dessa e outras culturas contendo BRS. No entanto, como o isolamento e produção em larga escala de fagos para bactérias desse grupo é um processo laborioso e caro, uma alternativa seria o desenvolvimento de coquetéis composto por fagos de bactérias de fácil cultivo, de modo a obter coquetéis eficientes de fácil produção e de baixo custo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Descoberta dos bacteriófagos e surgimento da fagoterapia

Desde sua descoberta por Frederick Twort (1915) e Felix d'Herelle (1917) os bacteriófagos vêm sendo usados como agentes antimicrobianos em uma variedade de ambientes clínicos e agrícolas (KUTTER e SULAKVELIDZE, 2004). Dentre as várias vantagens do uso dos fagos como agentes de controle biológico estão: a sua eficiência contra bactérias resistentes a antibióticos (BRA); a especificidade viral; a habilidade de rapidamente responderem ao surgimento de bactérias resistentes a fagos, em ciclos de coevolução; o baixo custo da produção de produtos baseados em fagos; a segurança para as células eucariotas; sua presença cosmopolita, abundante e diversa na natureza; e o seu fácil cultivo e manipulação (DIAS *et al.*, 2013).

Em retrospecto, existem alguns relatos controversos na literatura do final do século XIX que sugerem a existência dos bacteriófagos (ABEDON *et al.*, 2011). Em um deles, Hankin (1896) sugeriu que as águas dos rios indianos Jumna e Ganges apresentavam atividade antisséptica contra vários tipos de bactérias, especialmente *Vibrio cholerae*. Como essa atividade era filtrável e sensível à fervura apenas em frascos abertos, ele concluiu que se tratava de uma substância química volátil. Abedon *et al.* (2011) sugerem que é imprudente assumir que tais características se trate de observações precoces da atividade de bacteriófagos, pois o aspecto antibacteriano dessas águas foi capaz de se manter eficiente mesmo após fervura por meia hora em tubos hermeticamente fechados. Além disso, os autores sugerem que a contagem de fagos nessas amostras deveriam ser excepcionalmente altas para atingir as taxas de morte bacteriana que Hankin observou. Um outro trabalho, conduzido por Emmerich e Löw (1901), demonstra que uma substância presente em culturas autolisadas tinha a capacidade de lisar várias outras culturas, curar infecções experimentais e ainda promover imunidade profilática para inoculações subsequentes. Apesar de que essas observações sejam compatíveis com a ação de bacteriófagos, é difícil tirar interpretações incontestáveis desses primeiros estudos, pois os resultados poderiam ser efeito de bacteriocinas ou ser atribuído à produção de enzimas líticas (KUTTER e SULAKVELIDZE, 2004).

Em 1915 uma observação peculiar do bacteriologista inglês Frederick W. Twort marcou o início das pesquisas com fagos. Durante sua tentativa de crescer o vírus

Vaccinia em ágar na ausência de células vivas, ele notou uma contaminação bacteriana por micrococcos, e percebeu que algumas colônias apresentavam aspecto mucoide, aquoso ou “vítreo” (TWORT, 1915). Essa “transformação vítrea”, como chamou, podia ser transmitida para outras colônias e ser propagada indefinidamente. Sob o microscópio, o aspecto das colônias vítreas era de pequenos grânulos, indicando que as bactérias ali presentes haviam degenerado. Twort então sugeriu que o acontecimento poderia ser causado por um vírus ultra-microscópico, uma forma de protoplasma vivo ou uma enzima com poder de crescimento, e que o agente causador da “transformação vítrea” poderia ser considerado como uma doença infecciosa aguda de *Micrococcus*.

Mas foi somente dois anos mais tarde, após o trabalho pioneiro do microbiologista franco-canadense Félix d’Herelle, que o relatório de Twort foi reconhecido como lidando com bacteriófagos. De forma independente, d’Herelle (1917) descobriu um agente antagonista das bactérias, que causava sua lise em culturas líquidas e formavam pontos discretos de morte celular (que ele chamou de placas) na superfície do ágar semeado com a bactéria. O pesquisador concebeu esses agentes como “ultravírus” que invadem as bactérias e se multiplicam, e por isso os chamou de bacteriófagos. Em uma época onde as doenças bacterianas assolavam a humanidade sem que houvesse metodologias efetivas de controle, d’Herelle rapidamente identificou o potencial que sua descoberta carregava. Ele então passou a estudar e defender os fagos como agentes terapêuticos na era pré-antibiótica, dando início ao que chamamos atualmente de fagoterapia (FRUCIANO e BOURNE, 2007).

Nos anos seguintes à descoberta dos bacteriófagos, resultados promissores foram obtidos com a fagoterapia, tornando os fagos importante ferramenta no controle de infecções bacterianas em humanos e animais (KUTTER e SULAKVELIDZE, 2004; KEEN, 2012; CISEK *et al.*, 2017). No entanto, a eficácia do tratamento usando os fagos eram inconsistentes. Isso se deve principalmente ao conhecimento restrito que os pesquisadores da época detinham a respeito da biologia básica dos fagos, aliado ao seu uso descontrolado e entusiástico (DIAS *et al.*, 2013; KEEN, 2012). Com o surgimento dos antibióticos nos anos 30 e a conjuntura da Segunda Guerra Mundial, a rejeição à fagoterapia se intensificou, especialmente nos Estados Unidos (KUTTER e SULAKVELIDZE, 2004; CISEK *et al.*, 2017). O amplo espectro de atividade aliado à facilidade e baixo custo de produção eram vantagens dos antibióticos que fizeram com

que a fagoterapia fosse descartada em todo Ocidente como uma abordagem desnecessária para um problema já resolvido (KEEN, 2012; CISEK *et al.*, 2017).

Em contraste, na União Soviética os fagos continuaram a ser usados como tratamento médico para curar feridas e desinterias, num contexto principalmente ideológico e militar (KUTTER e SULAKVELIDZE, 2004; CISEK *et al.*, 2017). A fagoterapia também continuou na Alemanha e em alguns países do leste Europeu como a Polônia (KUTTER e SULAKVELIDZE, 2004; KEEN, 2012). Na França, por exemplo, relatórios científicos regulares sobre a fagoterapia continuaram até pelo menos 1979 (GOLKAR *et al.*, 2014). No entanto, mesmo nesses países a fagoterapia para o tratamento de infecções humanas perdeu força do meio para o final do século 20, e o uso indiscriminado dos antibióticos prosseguiu (GOLKAR *et al.*, 2014, BRIVES e POURRAZ, 2020).

Nas últimas décadas, a emergência das bactérias resistentes a antibióticos (BRA) fez com que as infecções bacterianas se tornassem uma ameaça novamente. A crise de resistência a antibióticos tem sido atribuída ao uso indevido e excessivo dessas drogas, bem como a falta do desenvolvimento de novas moléculas pela indústria farmacêutica (WITZANY, 2020). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) um crescente número de infecções, como pneumonia, tuberculose, gonorreia e salmoneloses, tem se tornado mais difíceis (e algumas vezes até impossíveis) de tratar à medida que os antibióticos vão se tornando menos eficientes. A OMS alerta ainda que a resistência a antibióticos é hoje uma das maiores ameaças a saúde, segurança alimentar e desenvolvimento (WHO, 2020).

Em 2018, foram registradas cerca de 100 mil mortes devido a infecções causadas por BRA, e estima-se que 700 mil pessoas morrem anualmente por causa do problema (WITZANY, 2020). Nesse contexto, lideranças de diversos países vem juntando esforços para controlar o aumento da resistência a antibióticos através de iniciativas que visam principalmente a diminuição do uso indiscriminado de tais compostos, melhoria do saneamento, higiene e conscientização sobre as BRA, rastreamento mais rápido da resistência, incentivo à pesquisa, otimização de uso dos antibióticos, entre outras (WALIA, 2019).

A resistência a antibióticos fez reacender então o interesse nos bacteriófagos, que nas últimas décadas voltou a se tornar uma importante ferramenta de controle microbiano (DIAS *et al.*, 2013). O desenvolvimento de biotecnologias baseadas em fagos tem ganhado espaço, seja na saúde humana, animal ou biocontrole no setor

agroalimentar (HÅUSLER, 2006; KUCHMENT, 2011). É nesse último setor, na verdade, que as iniciativas têm sido mais bem-sucedidas. Vários sistemas já foram aprovados pelas autoridades para uso em produtos alimentícios, como o ListShield (Intralytix) ou LISTEX (Microcos Food Safety) para o controle de *Listeria monocytogenes*, EcoShield (Intralytix) contra *Escherichia coli* O157: H7 e SALMONELEX (da Microcos Food Safety) para o controle de *Salmonella* (HENRY e DEBARBIEUX, 2012; RODRÍGUEZ-RUBIO *et al.*, 2016). Os fagos também são usados na agricultura convencional e orgânica para proteger culturas de tomate e pimenta dos patógenos *Xanthomonas pestis* e *Pseudomonas syringae*, na forma de um produto denominado Agriphage, da companhia Omnilytics (ŽACZEK *et al.*, 2015).

A fagoterapia também tem sido cada vez mais estudada para tratar patógenos humanos. Diversos são os trabalhos que testam a eficiência dos fagos em modelos animais para controle de patógenos como *Klebsiella pneumoniae* (KUMARI *et al.*, 2011; SINGLA *et al.*, 2015; CHADHA *et al.*, 2016), *Pseudomonas aeruginosa* (CHANG, 2017; OECHSLIN *et al.*, 2017; JEON e YONG, 2019), *Staphylococcus aureus* (CHHIBBER *et al.*, 2013; MENDES *et al.*, 2013), *Acinetobacter baumannii* (YIN *et al.*, 2017), *E. coli* (DA SILVA DUARTE *et al.*, 2018; VAHEDI *et al.*, 2018; DUFOUR *et al.*, 2019), e muitos outros. No entanto, o desenvolvimento de produtos baseados na fagoterapia enfrenta vários obstáculos devido à ausência de regulações que atendam especificamente às peculiaridades desse tipo de produto (BRIVES e POURRAZ, 2020; PIRES *et al.*, 2020). Desde 2011, os fagos são considerados um medicamento nos Estados Unidos e na União Europeia, o que levanta desafios de fabricação e formulação (BRIVES e POURRAZ, 2020). Para amplas aplicações médicas, os fagos precisariam ser produzidos em grande escala de acordo com as Boas Práticas de Fabricação (BPF) aprovadas por agências regulatórias (BRIVES e POURRAZ, 2020; PIRES *et al.*, 2020). Também são necessários dados claros da eficiência dos fagos em testes clínicos controlados e randomizados e, apesar do número crescente desses ensaios, apenas alguns estão atualmente concluídos (BRIVES e POURRAZ, 2020; PIRES *et al.*, 2020). Por fim, esses produtos devem obter autorização de comercialização. Pesquisa e desenvolvimento com fagos para aplicação médica são, portanto, colocados dentro da estrutura de uma economia de medicamentos baseado na indústria, o que aumenta significativamente o custo do produto final e reduz sua eficácia (BRIVES e POURRAZ, 2020).

Apesar das dificuldades, a fagoterapia no tratamento de infecções humanas já tem aplicação em alguns países, como a Rússia, onde o uso de coquetel de fagos já é uma realidade. A companhia russa Microgen (en.microgen.ru/) desenvolve preparações de fagos em suspensão ou em comprimidos para diversas infecções, por exemplo disenterias, infecções por *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, além de coquetéis de bacteriófagos (MCCALLIN *et al.*, 2013). As pesquisas nessa área têm atraído maior interesse global e a incorporação da fagoterapia no tratamento de infecções tem sido apoiada pelo governo de vários países. O Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas (*National Institute of Allergy and Infectious Diseases - NIAID*) dos Estados Unidos, por exemplo, listou a fagoterapia como um dos sete pilares no seu plano de pesquisa para combater a resistência aos antibióticos. Além disso, a Sociedade Americana de Microbiologia (*American Society for Microbiology - ASM*) apoia o Phagoburn: o primeiro centro multi-núcleo geral de clínica da fagoterapia para infecções humanas, financiado pela Comissão Europeia, no âmbito do 7th Framework Programme for Research and Development. O Phagoburn é um projeto inicialmente focado no tratamento de pacientes vítimas de queimaduras e, ao mesmo tempo, portadores de infecções por *Escherichia coli* ou *Pseudomonas aeruginosa* (www.phagoburn.eu/).

2.2 Bacteriófagos: definição e classificação

Bacteriófagos, também chamados de fagos, são vírus que infectam bactérias, dentro das quais eles podem se replicar (D'HERELLE, 1917). São os organismos mais diversos e abundantes do planeta, com uma população global estimativa de 10^{30} a 10^{32} partículas (KUTTER e SULAKVELIDZE, 2004). Apesar disso, estima-se que menos de 0,0002% da diversidade global de bacteriófagos foi amostrada (IGNACIO-ESPINOZA *et al.*, 2013). Os fagos podem ser encontrados nos mais distintos locais, como no solo, água do mar, águas residuais e também em condições extremas (PRINCIPI *et al.*, 2019). São considerados um dos principais influenciadores da evolução bacteriana e desempenham importante papel na regulação do equilíbrio microbiano, seja causando sua morte ou realizando transferência horizontal de genes, que altera os fenótipos bacterianos e conduz à expressão de genes de virulência (PAUL, 1999; DIAS *et al.*, 2013).

A classificação dos bacteriófagos é de responsabilidade do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) e, apesar de ainda não existir um método universal para a classificação desses fagos, eles são mais comumente agrupados de acordo com sua morfologia e com a composição de seu material genético (www.ictvonline.org/). Em 1974 os fagos foram separados por morfotipos para facilitar a identificação por microscopia eletrônica (ACKERMANN e EISENSTARK, 1974). Os fagos são extremamente heterogêneos em suas propriedades estruturais, físico-químicas e biológicas, o que sugere sua origem polifilética (KUTTER e SULAKVELIDZE, 2004). A grande maioria possui genoma constituído de DNA fita dupla (dsDNA); no entanto, DNA fita simples (ssDNA), RNA fita simples (ssRNA) ou RNA fita dupla (dsRNA) são encontrados em pequenos grupos de fagos (KUTTER e SULAKVELIDZE, 2004).

A grande maioria dos fagos já visualizados são caudados, pertencentes à ordem *Caudovirales*, e constituem o maior e mais difundido grupo de vírus bacterianos (ACKERMANN, 1998; PAEZ-ESPINO, 2016; NISHIMURA *et al.*, 2017). Os vírions dessa ordem consistem em um envoltório de proteína e dsDNA linear, com tamanho variando de 18 a 500 mil pares de bases (KUTTER e SULAKVELIDZE, 2004). Suas cabeças são icosaédricas regulares (85% dos fagos com cauda) ou prolatas, e as caudas são verdadeiras hélices ou consistem em discos empilhados que geralmente possuem estruturas de adsorção terminal, como placas de base, espículas ou fibras (ACKERMANN, 1998). Essas estruturas são responsáveis por fazer a ligação à célula hospedeira alvo e pelo transporte do material genético para o interior da célula (CASJENS, 2005; ACKERMANN, 2007).

A ordem *Caudovirales* é composta por 14 famílias, sendo elas: *Ackermannviridae*, *Autographiviridae*, *Chaseviridae*, *Demereciviridae*, *Drexelviriidae*, *Guelinviridae*, *Herelleviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae*, *Rountreeviridae*, *Salasmaviridae*, *Schitoviridae*, *Siphoviridae* e *Zobellviridae* (ICTV, 2020). Apesar dessa notável diversidade, a grande maioria dos fagos caudados são classificados em três famílias não monofiléticas que foram historicamente estabelecidas com base em características morfológicas (TURNER *et al.*, 2021). Essas famílias são: 1) *Myoviridae*, com cauda contrátil consistindo de uma bainha e um tubo central; 2) *Siphoviridae*, com cauda longa e flexível e não contrátil; e 3) *Podoviridae*, com cauda curta e não contrátil (ACKERMANN, 1998). Segundo Ackermann (1998), as três famílias apresentam considerável sobreposição em suas propriedades físico-químicas e não podem ser

diferenciadas por essas características. No entanto, os capsídeos dos miovírus tendem a ser maiores e conter mais DNA do que os das outras duas famílias (ACKERMANN, 1998).

É importante salientar aqui que as famílias *Myoviridae*, *Siphoviridae* e *Podoviridae*, foram recentemente revisadas e novas famílias foram criadas (ICTV, 2020), realocando membro das antigas famílias para as novas. Com isso, fagos com morfologia tipo miovírus, por exemplo, não mais podem ser definidos como membros da família *Myoviridae* apenas por suas características morfológicas, visto que os fagos pertencentes as novas famílias derivadas de *Myoviridae* (*Ackermannviridae*, *Chaseviridae* e *Herelleviridae*) apresentam a mesma morfologia (TURNER *et al.*, 2021). Assim, a classificação dos fagos em famílias e a subdivisão das famílias dos fagos caudados em subfamílias, gêneros e subgêneros deve ser feita com base no tamanho e nas características do genoma, assim como a gama de hospedeiros dos vírus (ADRIAENSSENS *et al.*, 2020).

2.3 Mecanismos e ciclos de infecção dos bacteriófagos

A infecção por bacteriófagos ocorre quando há a ligação entre a partícula viral e uma célula hospedeira suscetível. Inicialmente, ocorre a adsorção da partícula viral a receptores de superfície do hospedeiro, em um processo que é específico e pode ser reversível ou irreversível (PRINCIPI *et al.*, 2019). A adsorção reversível é influenciada por interações eletrostáticas. Já a irreversível tem ligações mais estáveis e ação de enzimas hidrolíticas (DRULIS-KAWA *et al.*, 2012). A adsorção reversível fornece o reconhecimento primário da célula, que às vezes é menos específico em comparação com a adsorção irreversível. Nesse estágio, a dissociação das partículas virais da superfície celular é possível com preservação da viabilidade viral. A transição para a adsorção irreversível geralmente requer ligação adicional de uma proteína do fago a algum receptor secundário, usando a mesma ou outra proteína de ligação ao receptor (PLR) empregada para ligação reversível. O reconhecimento do receptor secundário é seguido por rearranjos na estrutura do vírion, que são necessários para criar um canal através do envelope celular para a ejeção do genoma do fago (LETAROV KULIKOV; 2017).

Existem dois tipos principais de receptores bacterianos aos quais os fagos se ligam: componentes da superfície, como lipopolissacarídeos (LPS), ácidos teicóicos e

porinas, e pílus sexual (DRULIS-KAWA *et al.*, 2012, NOBREGA *et al.*, 2018). No caso de vírus da ordem *Caudovirales*, as PLR presentes nas fibras da cauda, espículas da cauda e ponta da cauda viral geralmente são responsáveis pela ligação com os receptores bacterianos, sendo a gama de hospedeiros desse bacteriófago definida pelo tipo de fibras da cauda desse vírus (MILLER *et al.*, 2003; CHATURONGAKUL e OUNJAI, 2014).

A etapa seguinte a adsorção é a injeção do material genético dos bacteriófagos no interior da célula bacteriana, após a degradação do peptidoglicano e formação de poros na parede celular da bactéria pela atividade das lisozimas fágicas (DRULIS-KAWA *et al.*, 2012). Os processos subsequentes a essa etapa vão depender do ciclo biológico de cada fago. Para a produção das novas partículas, os genes precoces dos fagos redirecionam a maquinaria de síntese bacteriana para que sejam produzidos os ácidos nucleicos e as proteínas virais (DRULIS-KAWA *et al.*, 2012). Em seguida, ocorre a montagem e o empacotamento dos vírions (MAURICE *et al.*, 2013). A lise celular do hospedeiro e a liberação das progênes virais envolve a produção de proteínas virais tardias e depende do ciclo biológico de cada fago.

Os fagos podem ser divididos em duas classes com base no seu ciclo biológico: virulentos ou temperados. Fagos virulentos só podem multiplicar por meio do ciclo lítico: as partículas fágicas adsorvem à superfície da célula hospedeira e injetam seu genoma, que assume grande parte do metabolismo do hospedeiro e faz com que a célula produza mais fagos (KUTTER e SULAKVELIDZE, 2004). Os fagos líticos, ou virulentos, têm altas taxas de replicação, e provocam a lise da célula hospedeira por meio do acúmulo de grande quantidade de vírus e de proteínas expressas tardiamente por eles, como endolisinas, holinas ou inibidoras da síntese de mureína (MAURICE *et al.*, 2013). Após a lise celular, grande quantidade desses bacteriófagos são liberados no ambiente.

Em contrapartida, os fagos temperados conseguem estabelecer uma condição chamada lisogenia, onde podem alterar seu modo reprodutivo. Às vezes, o fago infectante inicia um ciclo lítico, resultando na lise da célula e na liberação de novas partículas, como descrito anteriormente (KUTTER e SULAKVELIDZE, 2004). Alternativamente, o fago infectante pode iniciar um ciclo lisogênico; em vez de se replicar, o genoma do fago assume um estado quiescente denominado profago, frequentemente integrado ao genoma do hospedeiro, mas às vezes mantido de forma epissomal (KUTTER e SULAKVELIDZE, 2004). Nesse estado, há silenciamento da

expressão de genes do fago, a partir de proteínas que conferem à bactéria imunidade a esses vírus. Ele permanece nessa condição integrada indefinidamente, tendo seu material genético replicado à medida que sua célula hospedeira se reproduz. Essas células são ditas lisogenizadas ou lisogênicas (isto é, capazes de produzir lise) porque um desses profagos ocasionalmente sai de sua condição quiescente e inicia o ciclo lítico (KUTTER e SULAKVELIDZE, 2004).

Essa mudança de ciclo lisogênico para lítico pode acontecer devido a estresses físico-químicos causados, por exemplo, por radiação UV e mitomicina C (KUTTER e SULAKVELIDZE, 2004). Através da lisogenia, o hospedeiro adquire imunidade à superinfecção por fagos relacionados ao invasor, pois o genoma de alguns fagos lisogênicos possui genes capazes de modificarem os receptores da célula bacteriana infectada, evitando que outros vírus se adsorvam (MARKINE-GORIAYNOFF *et al.*, 2004; KUTTER e SULAKVELIDZE, 2004). Pode também haver a aquisição de resistência a antibióticos e de sequências que influenciem na expressão de toxinas (conversão lisogênica), como a toxina Shiga de *E. coli*, aumentando a aptidão (*fitness*) da bactéria (KUTTER e SULAKVELIDZE, 2004).

No entanto, as bactérias podem resistir à infecção fágica através de diferentes mecanismos, como: sistemas de bloqueio da adsorção (bloqueio de receptor, produção de matriz extracelular e produção de inibidor competitivo); mecanismos de prevenção da integração do DNA por sistemas de exclusão de superinfecção; sistemas de modificação por restrição; imunidade adaptativa via sistema CRISPR-Cas; bloqueio da replicação, transcrição, tradução ou montagem do vírion através de infecção abortiva; variação de fase; e, o mais comum, a ausência, perda ou alteração (p. ex. mutações espontâneas) dos componentes da superfície bacteriana que agem como receptores para os fagos (LABRIE *et al.*, 2010; OECHSLIN, 2018).

Por exemplo, algumas bactérias podem carregar plasmídeos contendo genes de proteínas que podem mascarar ou alterar a conformação de receptores de fago, como a proteína transportadora TraT codificada pelo plasmídeo F de *E. coli*, que é incorporada na membrana externa e mascara o receptor OmpT necessário para a infecção por uma ampla gama de bacteriófagos T-even de *E. coli* (RIEDE e ESCHBACH, 1986). A variação de fase é outro mecanismo que altera as estruturas da superfície celular em algumas bactérias, seja estocasticamente ou em resposta a estímulos particulares (KIM e RYU, 2012). É um fenômeno biológico geneticamente programado que ocorre em bactérias que precisam se adaptar a diferentes ambientes.

Essas bactérias podem modificar seus componentes celulares de acordo com as condições ambientais por meio da regulação de uma complexa rede de expressão gênica (AHMAD *et al.*, 2017). Kim e Ryu (2012) demonstraram que em um sorotipo de *Salmonella enterica* a glicosilação de resíduos de galactose no antígeno O12 (usado como um aparelho auxiliar necessário ao sucesso de infecção fágica) por genes de glicosilação do antígeno-O de fase variável resultava em uma resistência transitória e sem custos à infecção por um fago lítico *T5-like*, visto que não envolvia mutações no gene *btuB*, que codifica a proteína BtuB usada como receptor para o fago. Os autores ainda sugeriram que esse desligamento temporal da adsorção do fago por meio da modificação antigênica de fase variável pode ser difundido entre os sistemas fago-bactéria Gram-negativa.

No entanto, os fagos sendo parceiros permanentes das bactérias, evoluem e se adaptam aos novos receptores, seja através da aquisição de novos genes da fibra da cauda, utilizando componentes da matriz extracelular como novos receptores ou ainda produzem enzimas degradadoras de EPS (STUMMEYER *et al.*, 2010; HAMDY *et al.*, 2017). Além disso, mudança nos fatores de virulência de superfície podem tornam a bactéria resistente ao fago menos virulenta e mais susceptível a antibióticos (GERMAN e MISRA, 2001; LABRIE *et al.*, 2010; LEÓN e BASTÍAS, 2015).

2.4 Bacteriófagos no controle de biofilmes bacterianos

Uma outra importante aplicação dos bacteriófagos é no controle dos biofilmes bacterianos em dispositivos médicos e superfícies industriais (HOSSEINIDOUST e OLSSON, 2014; RODRÍGUEZ-RUBIO *et al.*, 2016). Biofilmes são comunidades microbianas que se desenvolvem aderidas a uma superfície, onde diferentes espécies vivem integradas e cercadas por uma complexa matriz de substâncias poliméricas extracelulares (*Extracellular Polymeric Substances* - EPS) (STOODLEY *et al.*, 2002; FISH *et al.*, 2016). Esse arranjo celular é problemático especialmente em ambientes industriais e hospitalares, pois podem impedir o fluxo de calor através de superfícies, aumentar a corrosão de determinados materiais, entupir capilaridades, abrigar bactérias patogênicas e BRA, e servir de fonte de recontaminação do ambiente pela liberação de células aderidas (DIAS *et al.*, 2013; FISH *et al.*, 2016; FISH *et al.*, 2017).

Bactérias embebidas nos biofilmes são consideradas menos susceptíveis a desinfetantes e antibióticos que as células planctônicas, devido tanto às suas taxas

de crescimento reduzidas quanto ao acesso limitado dos antimicrobianos às células bacterianas no biofilme (RODRÍGUEZ-RUBIO *et al.*, 2016; STEWART e COSTERTON, 2001; NGUYEN *et al.*, 2011). Os biofilmes também favorecem a transferência horizontal de genes, que pode ser significativamente maior que nas bactérias que vivem em suspensão, acelerando assim o processo de aquisição de genes de resistência a antibióticos (GRA) pelas bactérias ali presentes (MOLIN e TOLKER-NIELSEN, 2013). Dessa forma, a eliminação dos biofilmes bacterianos é tarefa difícil e dispendiosa, que muitas vezes exige o uso de altas doses de antibióticos e outros produtos químicos (FISH *et al.*, 2016).

O uso dos fagos para tratamentos dessas superfícies pode prevenir a formação do biofilme, reduzir o uso de antimicrobianos químicos e ainda limitar a disseminação de GRA no ambiente (DIAS *et al.*, 2013). Os fagos são capazes de lisar bactérias chave que mantêm a estrutura do biofilme através de enzimas como as endolisinas, hidrolases de peptidoglicano envolvidas na lise das células bacterianas durante a replicação dos fagos (RODRÍGUEZ-RUBIO *et al.*, 2013; DĄBROWSKA *et al.*, 2014; ROACH e DONOVAN, 2015). De forma geral, as endolisinas contêm um domínio enzimaticamente ativo e um domínio de ligação à parede celular (ROACH e DONOVAN, 2015). A maioria das endolisinas fágicas são espécie-específicas, mas algumas são mais promíscuas (HARADA *et al.*, 2018).

Outra enzima fágica com importante potencial biotecnológico contra os biofilmes estão as depolimerases, enzimas difusíveis que reduzem os níveis de polímeros de superfície como exopolissacarídeos e lipopolissacarídeos (LPS) (ROACH e DONOVAN, 2015). As depolimerases são divididas de acordo com seu modo de ação em: a) hidrolases, que inclui as sialidases, ramnosidases, levanases, xilanases, dextranases e LPS desacetilases; e b) liases, que clivam uma ligação glicosídica por eliminação trans- β e inclui hialuronato liase, pectato liase, alginato liase e K5 liase (MACIEJEWSKA *et al.*, 2018). Essas enzimas geralmente apresentam uma grande diversidade na especificidade do substrato. No entanto, se um determinado local de clivagem estiver presente em diferentes tipos de polissacarídeos, a enzima pode atuar em diferentes substratos (KNECHT *et al.*, 2020). Em vez de lisar as células, a remoção de polissacarídeos pode desarranjar os componentes da matriz do biofilme, expondo as células bacterianas à infecção por novas partículas fágicas e a estresses físicos (p. ex, dissecação) e químicos (p. ex, antibióticos) (LU e COLLINS, 2007; BAKER *et al.*, 2002; BHATTACHARJEE *et al.*, 2015). Além disso, por causa da ação inespecífica

dessas hidrolases, é possível isolar um fago de uma espécie de fácil cultivo e utilizá-lo no controle do biofilme de outra espécie de crescimento e cultivo mais fastidiosos (K CHAN e T ABEDON, 2015; MACIEJEWSKA *et al.*, 2018;).

Uma outra vantagem na utilização dos fagos para controlar biofilmes é que, ao contrário dos antimicrobianos, cuja concentração vai diminuindo ao longo do tempo, os fagos são capazes de se replicar e, caso a taxa de fagos e células viáveis estiverem em um alcance ideal, eles podem se manter no ambiente infectando a bactéria hospedeira até que ambos desapareçam, em uma típica relação predador-presa (LEVIN e BULL, 2004; MATHIEU *et al.*, 2019). Além disso, as células que persistem aderidas no biofilme podem ser infectadas por bacteriófagos. Apesar de não poderem replicar e lisar as células inativas, os fagos podem permanecer dentro dessas bactérias até que elas retomem a atividade metabólica celular e, então, os fagos podem iniciar a infecção e posteriormente a lise (HARPER *et al.*, 2014).

Esses organismos também são capazes de diminuir o *fitness* da população alvo através da seleção de bactérias que são mais susceptíveis aos biocidas ou a exclusão competitiva (MATHIEU *et al.*, 2019). Isso acontece porque as bactérias desenvolvem resistência aos fagos diminuindo a expressão de receptores fágicos na sua superfície celular (LABRIE *et al.*, 2010). Esses receptores incluem proteínas importantes para o metabolismo bacteriano, como a proteína LamB responsável pela difusão de açúcares (NOBREGA *et al.*, 2018) e a bomba de efluxo de antibiótico em *Escherichia coli*, TolC, que contribui para a resistência à antibióticos (GERMAN e MISRA, 2001). Assim, a resistência fágica vem com um custo para as bactérias hospedeiras.

Como os biofilmes são normalmente formados por múltiplas espécies, os tratamentos com fagos podem exigir o uso de coquetéis fágicos ou fagos combinados com outros antimicrobianos para atingir as espécies acompanhantes (SILLANKORVA *et al.*, 2010; CHHIBBER *et al.*, 2015; GONZÁLEZ *et al.*, 2016). Como exemplo do sucesso da aplicação de coquetéis fágicos para controle de biofilme pode-se citar o trabalho realizado por Chhibber *et al.* (2015). Os autores observaram uma remoção mais eficiente do biofilme composto por *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* quando tratado com um coquetel fágico contendo um fago específico para *P. aeruginosa* (Pa29) e um fago específico para *K. pneumoniae* (KPO1K2) do que quando tratado pelos respectivos fagos sozinhos. Esse fato foi tribuído à depolimerase produzida pelo fago KPO1K2 que hidrolisou a camada superior de *K. pneumoniae* e permitiu a entrada de Pa29 para alcançar as células de *P. aeruginosa*

por baixo (CHHIBBER *et al.*, 2015). Resultado semelhante foi alcançado por SILLANKORVA *et al.* (2010) que, usando um coquetel com fagos específicos para *P. fluorescens* e para *Staphylococcus lentus* para tratar o biofilme formado por essas duas espécies bacterianas, relataram efetiva remoção do biofilme e morte dos hospedeiros.

Fagos específicos para apenas uma espécie bacteriana da comunidade do biofilme também podem proporcionar resultados promissores na eliminação do biofilme total. Sillankorva *et al.* (2010) observaram que a exposição do biofilme de dupla espécie ao fago específico apenas para *P. fluorescens* danificou parcialmente a estrutura do biofilme após infecção e lise das células hospedeiras, e liberou as células de *S. lentus* para a fase planctônica, permitindo que essas ficassem susceptíveis ao tratamento com biocidas. González *et al.* (2016) reportaram a eficácia do fago philPLA-RODI de *Staphylococcus aureus* em biofilmes de dupla-espécie formados pela bactéria patogênica *S. aureus* em combinação com *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* ou *Lactobacillus pentosus*. Apesar da propagação do fago philPLA-RODI ter sido maior nos biofilmes formados por *S. aureus* - *L. pentosus* em comparação com os biofilmes formados por *S. aureus* e as outras duas espécies restantes, as análises de microscopia mostraram que o tratamento com o fago tornou todos os biofilmes de espécies mistas mais planos e menos organizados, à medida que reduziu o número de células intactas de *S. aureus* (GONZÁLEZ *et al.*, 2016).

Alguns trabalhos tem demonstrado também a utilização de fagos não específicos no controle de biofilmes. Da Silva Duarte *et al.* (2018) reportaram a capacidade de um fago de *E. coli*, um *T4vírus*, de prevenir a formação do biofilme de *Trueperella pyogenes*, um patógeno oportunista que infecta muitas espécies animais e, juntamente com *E. coli*, causa a mastite bovina em vacas leiteiras. A análise molecular do *T4vírus* revelou um repertório de hidrolases de peptidoglicano associadas a vírions (*virion-associated peptidoglycan hydrolases* – VAPGH), e em um MOI de 10 o fago foi capaz de reduzir de forma significativa a formação do biofilme de *T. pyogenes*. Os autores hipotetizaram então que fagos heterólogos com um grande número de hidrolases de peptidoglicano associadas a vírions (*virion-associated peptidoglycan hydrolases* – VAPGH) podem possuir atividade contra hospedeiros não relacionados quando usados em um MOI alto devido a ação de hidrolases inespecíficas (DA SILVA DUARTE *et al.*, 2018).

Belgini *et al.* (2014) também demonstraram a ação de um fago não específico no controle de biofilmes. Nesse estudo, os autores isolaram várias bactérias a partir da água de alimentação amostrada de um sistema de osmose reversa em refinaria de óleo da Petrobras. Eles testaram as bactérias quanto a habilidade de formar biofilme e então usaram aquelas que mais formaram biofilme para serem tratadas com um fago isolado de lodo ativado, que não era específico para nenhuma das bactérias. A habilidade do fago de reduzir a formação do biofilme da maioria das bactérias testadas revelou um amplo espectro de atividade, fazendo desse fago uma alternativa viável para o controle de biofilmes em sistemas de osmose reversa (BELGINI *et al.*, 2014).

2.5 Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) e uso de fagos para controle do biofilme

Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) são um grupo de microrganismos especialmente problemáticos na indústria petrolífera por causar grandes prejuízos relacionados à corrosão microbiologicamente influenciada (MIC) de tanques e tubulações, produção de gases tóxicos (H₂S) e diminuição da qualidade do petróleo “*souring*”. Esse grupo é constituído por procariotos estritamente anaeróbios e taxonomicamente diversos, que realizam a redução dissimilatória de compostos de enxofre, como sulfato, sulfito, tiosulfato e o próprio enxofre, em sulfeto (CASTRO *et al.*, 2000). Algumas espécies do gênero *Desulfovibrio* podem crescer com nitrato ou fumarato como aceptores de elétrons alternativos (BEECH, 2002). As BRS são anaeróbios estritos e, embora algumas cepas possam tolerar a exposição ao oxigênio e outras cepas, como *Desulfovibrio vulgaris* e *Desulfovibrio desulfuricans*, tenham até desenvolvido a capacidade de respiração aeróbia, elas parecem apenas obter energia de manutenção sem crescimento quando o oxigênio é usado como o aceptor final de elétrons (DANNENBERG *et al.*, 1992; THAUER *et al.*, 2007).

Os compostos orgânicos são os doadores de elétrons em seu metabolismo, gerando como produtos sulfeto de hidrogênio (H₂S) e dióxido de carbono (CO₂) (CASTRO *et al.*, 2000). As BRS podem ser heterotróficas, utilizando o carbono orgânico como fonte de carbono, ou autotróficas, as quais utilizam CO₂ como fonte de carbono (FAUQUE e BARTON, 2012). Também, são capazes de metabolizar desde ácidos graxos de cadeia curta (propionato e acetato) até ácidos graxos de cadeia longa e compostos aromáticos (como benzeno e fenol) (WIDDEL, 1980).

Os principais representantes de bactérias redutoras de sulfato incluem proteobactérias do subgrupo delta, como *Desulfovibrio*, *Desulfobacter* e *Desulfuromonas* mas novos gêneros também têm sido incluídos, dentre os quais bactérias termofílicas como *Thermodesulfobacterium*, gram-positivas como *Desulfotomaculum*, e um único gênero de Archaea, *Archaeoglobus* (KLENK *et al.*, 1997; MADIGMAN *et al.*, 2010; FAUQUE e BARTON, 2012).

As BRS podem ser encontradas em uma ampla variedade de ambientes aquáticos e terrestres, como ambientes marinhos, estuários, sedimentos e lagos salinos e hipersalinos, em águas de campos de exploração de petróleo, etc. (KLEIMKEMPER *et al.*, 2002). Também foram detectadas em ambientes com temperaturas extremas, como fontes hidrotermais e domo de lama vulcânica (ELSGAARD *et al.*, 1994), em locais com alta pressão, como fendas oceânicas, jazidas de petróleo (JEANTHON *et al.*, 2002) e em grandes profundidades, como as minas de ouro da África do Sul, aquíferos basálticos nos EUA (BAKER *et al.*, 2003) e poços petrolíferos do Golfo do México (MIRANDA-TELLO *et al.*, 2004).

Os representantes das BRS são comumente isolados de biofilmes formados em ambientes livres de oxigênio, sendo os “moradores” de fundo em biofilmes de culturas mistas (JIA *et al.*, 2019). Microrganismos aeróbios e facultativos da camada superior do biofilme fornecem um ambiente anaeróbio local que é necessário para o crescimento das BRS (JIA *et al.*, 2019). Além disso, durante seu crescimento, as BRS produzem uma grande quantidade de sulfeto de hidrogênio (H₂S) que garante a manutenção da anaerobiose. O crescimento desses microrganismos dentro de biofilmes contribui para problemas sérios em sistemas de campos petrolíferos, incluindo corrosão e acidificação “*souring*” de reservatórios (BALDWIN e SUMMER, 2012).

O fenômeno conhecido como “*souring*” ocorre devido à presença do H₂S, produzido quando microrganismos reduzem, enzimaticamente, sulfato, tiosulfato ou enxofre elementar a sulfeto com o objetivo de ganhar energia para seu crescimento (LIAMLEAM e ANNACHHATRE, 2007). O *souring* causa outros problemas além da acidificação do meio, tais como a precipitação do sulfeto de ferro, que é responsável pela obstrução “*fouling*” de tubulações e equipamentos. Outro aspecto negativo da presença de microrganismos nos reservatórios é que eles podem alterar a composição original do petróleo ou gás, uma vez que degradam os hidrocarbonetos presentes (RÖLING *et al.*, 2003). Além de tudo, o H₂S é um gás tóxico que reduz

severamente a qualidade do ar, levando a problemas de saúde e segurança em ambientes operacionais (TANG *et al.*, 2009).

As BRS também são responsáveis pela corrosão microbiologicamente influenciada (MIC) da infraestrutura e oxidação do metano nos reservatórios de petróleo e gás (BARTON e FAUQUE, 2009). É amplamente aceito que, na maioria dos casos, os biofilmes são responsáveis pela MIC, que leva à degradação de muitos materiais (XU *et al.*, 2017a). O aço carbono é amplamente utilizado como material de tubulação em muitas indústrias. Falhas em dutos podem levar a grandes perdas econômicas e sérios danos ambientais (BARTON e FAUQUE, 2009). Uma vez que microrganismos planctônicos geralmente não estão diretamente relacionados à MIC, a mitigação da MIC é sobre o controle de biofilmes (JIA *et al.*, 2019). No entanto, os microrganismos sésseis em biofilmes são muito mais difíceis de tratar do que os planctônicos. Normalmente, altas dosagens de biocidas são necessárias no campo para tratar biofilmes devido aos muitos mecanismos de defesa usados por biofilmes (BALDWIN e SUMMER, 2012).

Segundo Baldwin e Summer (2012) a indústria do petróleo gasta anualmente cerca de 2 bilhões de dólares em biocidas. Os biocidas de amplo espectro exigem despesas adicionais associadas à conformidade regulatória. Esses biocidas podem permanecer na água quando ela é bombeada para fora do poço, criando problemas de manuseio e descarte de resíduos (BALDWIN e SUMMER, 2012). Compreensivelmente, o uso de biocidas na indústria do petróleo está enfrentando uma resistência regulatória crescente devido ao impacto negativo no meio ambiente e aos riscos de saúde associados. Assim, uma abordagem nova e mais eficaz para controlar os biofilmes pode dar uma contribuição significativa para reduzir os danos causados pelas BRS na indústria do petróleo (SUMMER *et al.*, 2011).

Os bacteriófagos têm a capacidade de degradar a matriz de exopolissacarídeo que é um constituinte-chave dos biofilmes e desempenha um papel importante na proteção das células bacterianas contra os tratamentos químicos (BALDWIN e SUMMER, 2012). O potencial das partículas fágicas para combater o crescimento do biofilme bacteriano e a corrosão associada a biofilmes em dispositivos médicos e no setor industrial já foi demonstrado (GUTIÉRREZ *et al.*, 2016; MOTLAGH *et al.*, 2016; VÁZQUEZ *et al.*, 2017). Um desempenho semelhante nas indústrias de petróleo e gás permitiria o uso de bacteriófagos como um meio mais eficaz e direcionado de tratamento de biofilme do que os métodos atualmente implantados (HARADA *et al.*,

2018). A invenção relatada por Baldwin e Summer (2012) se refere ao controle de contaminação bacteriana, corrosão e incrustação, usando partículas de bacteriófagos líticos de ocorrência natural, contra bactérias-alvo. Uma vantagem das partículas de bacteriófago sobre o uso de biocida é sua capacidade de autorreplicação, que aumenta a dosagem do bacteriófago ao longo do tratamento (ZARASVAND e RAI, 2014).

No entanto, uma das grandes dificuldades para utilização dos bacteriófagos como biocidas é a extrema especificidade do fago por seu hospedeiro (ZARASVAND e RAI, 2014). As BRS não são um grupo homogêneo de bactérias, englobando membros de diversos grupos, e apesar de fagos que infectam BRS já terem sido isolados, eles limitam-se principalmente a *Desulfovibrio vulgaris* e *Desulfovibrio aespoeensis*, dificilmente infectando outras espécies, até mesmo do gênero *Desulfovibrio* (SEYEDIRASHTI *et al.* 1991; SEYEDIRASHTI *et al.*, 1992; WALKER *et al.*, 2006; EYDAL *et al.*, 2009; SUMMER *et al.*, 2011). Isso significa que o isolamento de novos fagos, específicos para determinado gênero ou espécie, é necessário antes da produção de fagos para uso como biocida (SUMMER *et al.*, 2011). No entanto, o isolamento de fagos de BRS apresenta dificuldades. Por se tratarem de bactérias anaeróbias é necessário criar um sistema de cultivo de células livre de oxigênio, além de serem organismos de crescimento lento e fastidioso, que requerem meios de cultivo complexos, tornando todo o processo de isolamento de novos fagos mais custoso e laborioso (SUTTLE, 2007; KREMER, 2017).

Outra questão importante é que, como mencionado anteriormente, microrganismos aeróbios e facultativos desenvolvem-se na camada superior do biofilme, fornecendo o ambiente anaeróbio, condição necessária para o crescimento das BRS e formando uma camada de proteção para essas bactérias. Assim, a eliminação do biofilme envolve não só a eliminação das BRS, mas também do biofilme formado pelas bactérias aeróbias. Como solução para esse problema tem sido proposta a utilização de fagos polivalentes ou coquetéis compostos por fagos isolados de diferentes bactérias hospedeiras (EYDAL *et al.*, 2009; BALDWIN e SUMMER, 2012; BELGINI *et al.*, 2014, CHATAIN-LY, 2014; ZARASVAND e RAI, 2014, 2014). Dessa forma, não só o espectro de hospedeiro poderia ser aumentado, mas também a gama de enzimas fágicas com potencial para degradação dos diferentes constituintes da matriz do biofilme.

É nesse contexto do desenvolvimento de estratégias para o controle de biofilmes

associados à indústria petrolífera que o presente trabalho tem foco. A Petrobras é uma empresa brasileira que opera nas áreas de exploração, produção, refino, comercialização e transporte de petróleo, gás natural e seus derivados (PETROBRAS, 2021). A presença das BRS nas plataformas de exploração e produção de petróleo é uma das principais causas de corrosão em linhas e equipamentos da empresa (DE ALMEIDA et al., 2009). A BRS47 é uma cultura mista isolada de uma plataforma desativada na Petrobras e está associada a problemas de corrosão e produção de H₂S em tanques de armazenamento. Nosso grupo de pesquisa tem trabalhado fortemente no isolamento de bacteriófagos líticos para espécies de BRS, a partir dessa e outras culturas contendo BRS. No entanto, como o isolamento e produção em larga escala de fagos para bactérias desse grupo é um processo laborioso e caro, uma alternativa seria o desenvolvimento de coquetéis composto por fagos de bactérias de fácil cultivo, de modo a obter coquetéis eficientes de fácil produção e de baixo custo.

3. OBJETIVOS

Objetivo geral

- Formular coquetéis fágicos e avaliar seu potencial no controle do biofilme de uma cultura mista de bactérias redutoras de sulfato.

Objetivos específicos

- Isolamento de bacteriófagos;
- Avaliação da ação dos bacteriófagos sobre a formação do biofilme de bactérias patogênicas e oportunistas;
- Avaliação da ação dos bacteriófagos sobre a formação do biofilme de bactérias redutoras de sulfato;
- Avaliação da ação de coquetéis contendo combinações de bacteriófagos sobre a formação do biofilme de bactérias redutoras de sulfato;
- Avaliação da estabilidade dos bacteriófagos dos coquetéis em diferentes condições de pH e temperatura, bem como em água do mar.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cepas bacterianas e condições de cultivo

Gêneros bacterianos da família Enterobacteriaceae e representantes de bactérias gram-positivas foram escolhidas para o isolamento dos fagos, espectro de hospedeiro e ensaio de biofilme (Tabela 1). As bactérias foram obtidas da coleção de microrganismos do Laboratório de Imunovirologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa (LIVM-UFV) e cultivadas em meio Luria Bertani (LB) (10 g NaCl₂, 10 g peptona e 5 g extrato de levedura por litro) sob agitação de 150 rpm e temperatura ótima de crescimento (T) de 30-37 °C. A densidade ótica (DO) das culturas foi mensurada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm (DO₆₀₀) de forma a inferir a fase do crescimento bacteriano.

Tabela 1. Gêneros bacterianos testados no isolamento dos fagos, espectro de hospedeiro e ensaio de biofilme.

Bactéria	Identificação (ATCC*)	T de cultivo	Gram
<i>Escherichia coli</i>	30	37 °C	-
<i>Escherichia coli</i>	K12-80	37 °C	-
<i>Escherichia coli</i>	SAN3	37 °C	-
<i>Enterobacter cloacae subsp. cloacae</i>	13047*	37 °C	-
<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	13076*	37 °C	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	37 °C	-
<i>Shigella flexneri</i>	12022*	37 °C	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	37 °C	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	13525*	30 °C	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853 *	37 °C	-
<i>Citrobacter freundii</i>	8090*	37 °C	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	30 °C	+
<i>Micrococcus luteus</i>	4698 *	30 °C	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	33591*	37 °C	+

4.2 Isolamentos dos fagos

Os fagos foram isolados seguindo o protocolo de enriquecimento de Van Twest e Kropinski (2009). Amostras foram coletadas das redes de esgoto doméstico do município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, e foram centrifugadas a 10.000 xg a 4 °C

por 10 min para remoção de partículas maiores. O sobrenadante foi filtrado em membrana PES 0,45 µm seguido de uma segunda filtração em membrana de 0,22 µm (Millipore, Billerica, MA, USA). Em seguida, 5 mL de meio LB estéril de força dupla (LB 2x- 20 g NaCl₂, 20 g peptona e 10 g extrato de levedura por litro) acrescido de CaCl₂ 2 mM (0,22 g/L) foi inoculado com 0,1 ml da cultura bacteriana de interesse em fase logarítmica de crescimento (D.O₆₀₀ ~ 0,7) e adicionado a 5 mL do filtrado. Os tubos contendo a mistura foram incubados à temperatura ótima de crescimento de cada bactéria e rotação de 100 rpm por aproximadamente 24 h. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 10.000 xg a 4 °C por 10 min e o sobrenadante (lisado) foi transferido para um novo tubo estéril.

Para testar se o lisado continha fagos ativos contra a bactéria hospedeira foi feito o teste de gotejamento (*spot-test*). Para isso, 0,9 mL de cultura previamente crescida da bactéria hospedeira (D.O₆₀₀ ~ 0,7) foi misturada a 4 mL de meio LB semi-sólido (0,7% de ágar m/v) fundido que foi então espalhado em placas de Petri contendo LB sólido (1,5% de ágar m/v). Após aproximadamente 10 min, 10 µL do lisado foi pipetado em cima do meio já solidificado e as placas foram incubadas durante a noite na temperatura ótima de crescimento da bactéria. Os lisados que deram resultado positivo (zonas de ausência de crescimento celular no local do gotejamento) foram submetidos a técnica do plaqueamento por dupla camada de ágar (ADAMS, 1959) e incubados durante a noite. As placas de lise resultantes foram recortadas, propagadas de forma independente e novamente plaqueadas por dupla camada. Esse processo foi repetido até que apenas uma morfologia de placa de lise fosse observada numa mesma placa, garantindo assim o isolamento de um único fago. Os fagos isolados foram titulados (ADAMS, 1959) e armazenados a 4 °C até utilização.

4.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para visualização das partículas virais foi utilizado a microscopia eletrônica de transmissão (MET). Previamente, os fagos isolados foram concentrados e purificados por ultracentrifugação, utilizando colchão de sacarose (20%) e rotação de 15.000 rpm a 4 °C por 7 h. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e o pellet solubilizado em 100 µL de água ultrapura. Então, 10 µL da solução contendo os fagos foi adicionada à grids cobertas com Formvar®. Após 5 min, o excesso de líquido foi removido com papel absorvente e a amostra foi contrastada com acetato de uranila

2% (m/v) por 15 s. A amostra foi mantida em desumidificador até análise no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 (Centro de Microscopia e Microanálise, Universidade Federal de Viçosa). As imagens das partículas fágicas foram analisadas quanto as dimensões da cauda e do capsídeo, utilizando o programa ImageJ (National Institutes of Health, EUA).

4.4 Espectro de hospedeiro

A determinação do espectro de hospedeiro foi realizada pela avaliação da curva de crescimento das bactérias na presença do fago em microplacas de poliestireno de 96 poços. Brevemente, uma alíquota de 20 μ L do fago (concentração final 10^7 UFP/mL) foi adicionado a 180 μ L de suspensão contendo a bactéria de interesse em início da fase exponencial de crescimento ($D.O_{600} \sim 0,1$). Poços controle receberam 20 μ L de SM ao invés do fago. As microplacas foram incubadas em espectrofotômetro Multiskan™ GO (Thermo Scientific, EUA) à temperatura de 37 °C durante 24 h. A densidade da população bacteriana ($D.O_{600nm}$) foi mensurada a cada 15 min pela leitura da absorvância a 600 nm.

4.5 Quantificação da biomassa total do biofilme formado por bactérias aeróbias

Após 24 h de avaliação da curva de crescimento, as microplacas foram colhidas e usadas para avaliar a capacidade dos fagos em reduzir a formação dos biofilmes bacterianos através de ensaio de quantificação de biomassa total de biofilme, pelo método de coloração por cristal violeta (DA SILVA DUARTE *et al.*, 2018). Brevemente, o meio de cultura da placa foi descartado e os poços lavados três vezes com solução salina (0,9% m/v) para remoção das células não aderidas. A placa foi mantida em estufa (aproximadamente 50 °C) por 1 h para secagem dos poços. As células aderidas foram fixadas com metanol por 15 min e então coradas com cristal violeta 0,1% (m/v) por 20 min. Após esse período, os poços foram lavados três vezes com a solução salina e secos em estufa durante 1 h. O corante ligado às células foi dissolvido usando 250 μ L de etanol-acetona (80:20 v/v) durante 15 min de incubação à temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi submetida à leitura da absorvância a 590 nm

(Abs_{590nm}), onde maiores valores de absorbância indicam maior produção de biomassa no biofilme.

4.6 Ação dos bacteriófagos isolados e em coquetéis sobre a formação de biofilme por uma cultura mista de bactérias redutoras de sulfato

A avaliação dos fagos e dos coquetéis fágicos quanto à sua eficiência em reduzir a formação do biofilme de uma cultura mista de BRS (BRS47) foi realizada em microplaca de 96 poços utilizando-se o meio anaeróbio Postgate E modificado (base água do mar) contendo: KH₂PO₄ (0,5 g/L), NH₄Cl (1,0 g/L), Na₂SO₄ (4,5 g/L), CaCl₂.6H₂O (0,06 g/L), MgCl₂.6H₂O (1,0 g/L), extrato de levedura (1,0 g/L), lactato de sódio 50% (7,0 mL), tioglicolato de sódio (0,13 g/L), resazurina 0,025% (4,0 mL); pH 7,6. Os biofilmes foram formados a partir do inóculo de 10% da cultura P47 ativa em volume de 180 µL. Os fagos e os coquetéis fágicos foram adicionados aos poços de modo a obter um título de 10⁷ UFP/mL em cada poço. Todo o procedimento foi realizado em câmara de anaerobiose (Whitley A95) a 30 °C sob atmosfera de H₂ (10%), CO₂ (10%) e N₂ (80%), na qual as placas foram incubadas durante 5 dias. A biomassa total dos biofilmes foi quantificada pelo método do cristal violeta, conforme descrito anteriormente.

4.7 Formulação dos coquetéis fágicos

Os coquetéis fágicos foram montados com base nos resultados obtidos da avaliação dos fagos isolados sobre o biofilme da cultura mista BRS47. Três coquetéis (Coq1, Coq2 e Coq3) foram montados pela combinação de fagos que possuem o mesmo hospedeiro (Tabela 2). Levando em consideração uma produção em larga escala, seria interessante conseguir produzir todos os fagos do coquetel usando apenas uma bactéria hospedeira. Os outros três coquetéis (Coq4, Coq5 e Coq6) foram montados pela combinação dos fagos que sozinhos foram significativos na redução da formação do biofilme da cultura mista BRS47 (Tabela 2). Os coquetéis foram preparados de forma que todos os fagos tivessem título final de 1x10⁷ UFP/mL nos poços das placas de 96 poços.

Tabela 2. Composição fágica dos coquetéis testados na cultura mista BRS47.

Nome do coquetel	Composição
Coq1	Eco1, Eco2 e Eco3
Coq2	Cit1, Cit2 e Cit3
Coq3	Shig1 e Shig2
Coq4	Eco1, Eco2 e Cit1
Coq5	Eco1, Eco2 e Shig1
Coq6	Eco1, Eco2, Cit1 e Shig1

4.8 Testes de estabilidade

Os fagos usados para a confecção dos coquetéis foram avaliados quanto à sua estabilidade em diferentes condições de pH e temperatura, seguindo os protocolos descritos por Jurczak-Kurek *et al.* (2016) com algumas modificações. Em cada um dos casos, logo após o tratamento, a preparação do fago foi diluída, plaqueada (ADAMS, 1959) e as placas incubada à 37 °C durante a noite, tendo o título viral (ADAMS, 1959) determinado no dia seguinte. A estabilidade foi determinada pela porcentagem de vírus capaz de produzir placa de lise após o tratamento, segundo a fórmula: $(\text{UFP/mL tratamento} \times 100) / (\text{UFP/mL controle})$. Os ensaios foram todos conduzidos em triplicata.

Para avaliação da estabilidade dos fagos em diferentes valores de pH, 100 µL de solução contendo o fago (1×10^5 UFP/mL) foram adicionados a 900 µL de meio LB (razão 1:9) ajustado com pH 2, pH 4, pH 7 (controle), pH 10 e pH 12. As amostras nos diferentes valores de pH foram incubadas à temperatura ambiente por 2 h.

A estabilidade térmica dos fagos foi avaliada pela incubação dos fagos diluídos em LB (concentração final 1×10^5 UFP/mL), nas temperaturas de -20 °C, 4 °C e 37 °C por 12 h, e nas temperaturas de 55 °C e 80 °C por, respectivamente, 2 h e 5 min. Fagos que não foram submetidos a nenhum tratamento térmico (temperatura “T” ambiente, por 12 h) foram usados como controle.

Também foi analisada a capacidade dos fagos de permanecerem estáveis em água do mar (salinidade 3,5%). Para isso, 100 µL de solução contendo o fago (1×10^5 UFP/mL) foi adicionado a 900 µL de água do mar natural previamente esterilizada. O mesmo volume de fago foi adicionado a meio LB e usado como controle. As preparações foram mantidas à temperatura ambiente por 24 h.

4.9 Análises estatísticas

Os ensaios de quantificação da biomassa total do biofilme foram conduzidos em cinco réplicas, e os ensaios de estabilidade foram conduzidos em triplicata. Os resultados foram apresentados como médias e desvio padrão, calculados usando o programa GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla CA USA). A significância estatística (p-value) foi calculada por análise de variância unilateral (one-way ANOVA) com nível de significância de 95%, usando o mesmo programa.

4.10 Construção de um bacteriófago GFP recombinante

Com o objetivo de monitorar a distribuição das partículas fágicas no biofilme, avaliando como essa distribuição influencia a formação e dispersão do biofilme em diferentes condições, tentou-se produzir por recombinação homóloga um fago recombinante que expresse GFP (proteína fluorescente verde). Para isso, um fago lítico do acervo do LIVM-UFV, *Escherichia virus* vB_EcoM_UFV09 (UFV09) (GenBank: MZ291552.1), foi utilizado como modelo. Esse fago foi escolhido por já ter o genoma sequenciado e todas as caracterizações biológicas investigadas (tempo de latência, tempo de adsorção, *burst-size*, espectro de hospedeiro, estabilidade em diferentes condições, dentre outras).

4.10.1 Construção do plasmídeo

O objetivo foi que a proteína GFP fosse expressa junto com a proteína constitutiva do capsídeo do UFV09, a MCP (Major Capsid Protein), na região C-terminal de MCP. Para isso, foi contruído um cassete contendo o gene *gfp* flanqueado por duas regiões de homologia com o genoma do fago UFV09: *upstream* de *gfp* foi adicionado um sequência de 150 pb do 3' terminal do gene *gp23* (que codifica a MCP) faltando o códon de parada e contendo um linker de 4 aminoácidos (PVAT) usados para fusionar GFP; *downstream* de *gfp* foi adicionado uma sequência de 150 pb, sendo 15 pb anteriores ao códon de início do gene *gp24* (que codifica a Capisid Vertex Protein) e 135 pb corresponde ao 5' terminal do gene *gp24*. O vetor de clonagem, um plasmídeo pUC57 contendo o cassete doador de DNA, foi sintetizado pela GenOne Biotechnologies. O esquema do cassete está representado na Figura 1 e

foi criado usando o software SnapGene (Insightful Science, disponível em snapgene.com).

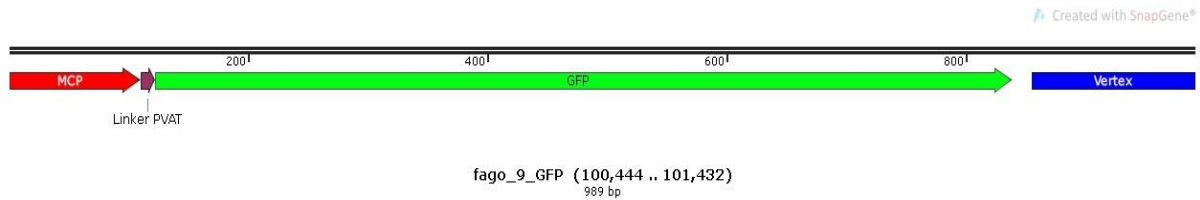


Figura 1. Esquema do cassete doador de DNA usado para a recombinação homóloga do fago UFV09 e inserção o gene da proteína verde fluorescente (GFP) no genoma do fago. *Upstream* do gene da GFP foi inserido uma sequência do gene da Major Capsid Protein (MCP). *Downstream* do gene da GFP foi adicionado uma sequência do gene que codifica a Capisid Vertex Protein (Vertex). Tamanho total da construção: 989 pares de base (base pairs – bp).

Transformação da bactéria

Células quimicamente competentes de *E. coli* SHuffle® T7 Express (New England Biolabs, EUA) foram transformadas com o plasmídeo por meio de choque térmico. Brevemente, 0,2 µL do plasmídeo foi adicionado a um tubo eppendorf contendo 30 µL de células competentes. O tubo foi incubado no gelo por 20 min, seguido por 30 s à 42 °C e novamente no gelo por mais 15 min. Depois, 110 µL de meio SOC (LB acrescido de 5% de glicose) foi adicionado ao tubo e levado para incubadora a 37 °C com agitação de 180 rpm por 30 min. Após esse período, as células foram espalhadas em placas de Petri contendo LB sólido (1,5% de ágar) acrescido de ampicilina (100 µg/mL) e incubadas a 37 °C overnight. As colônias que cresceram foram transferidas para tubos Falcon contendo 10 mL de meio LB com ampicilina (100 µg/mL) e novamente incubadas a 37 °C com agitação de 150 rpm overnight. Para confirmar a transformação das células o plasmídeo foi extraído e usado como modelo para amplificação do gene *gfp* por PCR, utilizando os primers *gfpF* e *gfpR* (Tabela 1). A reação de PCR usada foi: um ciclo de 95 °C por 5 min; 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 53 °C por 40 s e 72 °C por 1 min; e um ciclo de 72 °C por 5 min. Os produtos da reação foram então corridos em gel de Eletrofose em Agarose e as bandas dos amplicons foram comparadas com o marcador de corrida de 100 pb. As colônias com resultado positivo foram então armazenadas no glicerol (25%) a -80 °C.

Tabela 3. Primers utilizados nas reações de PCR e suas respectivas sequências de nucleotídeos.

Primers	Sequência
gfpF	GGTATCATGAGTAAAGGAGAAGAAC
gfpR	ACTATTTGTATAGTTCATCCATGCC
mcp/gfpF	GGGTTCAAACACTCGTTACGG
gfp/vertexR	ATTCGTTGTGGTTGATTCGC

F: Forward

R: Reverse

4.10.3 Recombinação homóloga e propagação do fago recombinante

Para integrar o gene *gfp* no genoma do fago UFV09 via recombinação homóloga, os fagos foram propagados nas bactérias transformadas com o plasmídeo. O protocolo para recombinação homóloga foi feito conforme descrito por Møller-Olsen *et al.* (2018) com algumas modificações. As bactérias transformadas foram incubadas em meio LB e ao atingir a DO_{600} 0,1 foi adicionado o fago a um MOI de 0,01 e mitomicina (MitC) na concentração final de 0,5 µg/mL. Depois de aproximadamente 5 h de incubação à 37 °C a mistura foi centrifugada (9000 xg por 10 min) para remover os resíduos celulares e o sobrenadante foi filtrado em filtros de 0,22 µm. O filtrado contendo os fagos foi então diluído em tampão SM e as diluições foram plaqueadas com *E. coli* 30 usando a técnica da dupla camada de ágar (ADAMS, 1959). As placas foram incubadas a 37°C durante a noite, sendo analisadas no dia seguinte em microscópio de fluorescência EVOS 5000 Imaging System (Thermo Fisher, EUA) usando o filtro para GFP (470/525 nm).

As placas de lise que apresentaram alguma fluorescência acima da fluorescência de fundo (*background*) foram recortadas e propagadas individualmente em 10 mL de meio LB, a 37 °C durante a noite. Outras placas de lise, de seleção aleatória, também foram propagadas de forma a aumentar a probabilidade de se obter uma população de fagos recombinados. Os fagos propagados foram então centrifugados e filtrados conforme descrito anteriormente. Mais três rodadas de propagação dos fagos recombinados foram conduzidas em *E. coli* 30, de forma a garantir que o lisado de fagos não contivesse células de *E. coli* SHuffle® contendo o plasmídeo. O DNA dos fagos purificados foram extraídos pelo método PCI/SDS (<http://phagesdb.org>) e utilizados nas reações de PCR usando os *primers* *gfpF* e *gfpR* para confirmação da presença do *gfp*. Um segundo par de *primers*, *mcp/gfpF* e

gfp/vertexR (Tabela 1), que amplificam parte das regiões flangeadoras do *gfp*, foram utilizados para averiguar se a inserção do *gfp* aconteceu no local desejado (região 5' da MCP).

Os fagos que tiveram confirmação pela PCR da presença do *gfp* foram então adicionados a uma cultura de *E. coli* 30 (DO₆₀₀ 0,1), de forma que o título final fosse 1×10^7 UFP/mL. Após 10 min de incubação a 37 °C a solução contendo fago recombinado e bactéria foi pipetada em uma lâmina de microscopia e levada para análise no microscópio de fluorescência com filtro GFP, conforme descrito anteriormente.

5. RESULTADOS

5.1 Isolamentos dos bacteriófagos

Após o procedimento de enriquecimento 10 bacteriófagos foram isolados (Tabela 4), sendo possível observar placas de lise nas culturas de *E. coli* (cepas 30, K12-80 e SAN3), *S. flexneri*, *C. freundii* e *M. luteus*. Após três ciclos de propagação foi possível obter fagos isolados com placas de lise de morfologia uniforme. Quase todos os isolados apresentaram título acima de 1.0×10^8 UFP/mL após propagação, com exceção do isolado Mic1 que inicialmente apresentou título inferior ($\sim 10^5$ UFP/mL). Novas rodadas de propagação do fago Mic1 foram conduzidas e observou-se que para obtenção de um título mais alto (10^7 - 10^8 UFP/mL) era necessário incubar o meio de propagação por aproximadamente 3 dias. Já os fagos isolados utilizando os hospedeiros *C. freundii* e *S. flexneri* conseguiram alcançar títulos elevados, na faixa de 10^{10} UFP/mL (Cit1, Cit2 e Cit3) e 10^{11} UFP/mL (Shig1 e Shig2).

Tabela 4. Bacteriófagos isolados a partir de amostras de esgoto e seus respectivos hospedeiros de isolamento.

Bacteriófagos	Hospedeiros de isolamento
Eco1	<i>E. coli</i> 30
Eco2 e Eco3	<i>E. coli</i> K12-80
Eco4	<i>E. coli</i> SAN3
Cit1, Cit2 e Cit3	<i>C. freundii</i>
Shig1 e Shig2	<i>S. flexneri</i>
Mic1	<i>M. luteus</i>

5.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A análise microscópica dos bacteriófagos isolados (Figura 2) revelou que todos pertencem a ordem de fagos caudados, *Caudovirales*. Foram identificados 4 representantes de miovírus, 3 de sifovírus e 3 de podovírus.

Os isolados Eco1 e Eco2 apresentaram morfologia semelhante, com capsídeo icosaédrico de formato regular (isométrico) e a cauda longa, espessa, rodeada por uma bainha que é separada do capsídeo por um espaço vazio ou “pescoço”, sendo, portanto, representantes de miovírus (Fig. 2). O isolado Eco3, também apresentou morfologia de miovírus, com capsídeo icosaédrico de formato regular e cauda longa e

espessa (Fig. 2). O fago Eco4 apresentou capsídeo icosaédrico de formato regular e cauda longa, estreita e flexível, morfologia típica dos sifovirus (Fig. 2). Os isolados Cit1 e Cit2 também apresentaram morfologia de sifovírus, com capsídeo icosaédrico de formato regular e cauda muito longa, estreita e flexível (Fig. 2). Já o fago Cit3 apresentou capsídeo icosaédrico de formato regular e cauda curta, morfologia tipo de sifovírus (Fig. 2). Os isolados Shig1 e Shig2 também apresentaram morfologia de sifovírus, com cauda curta. Interessantemente, ambos apresentaram capsídeo icosaédrico de formato alongado (prolato), morfotipo C3 (Fig. 2). Já o fago Mic1, outro miovírus, apresentou capsídeo icosaédrico de formato regular e cauda longa e flexível, porém espessa (Fig.2).

A Tabela 5 apresenta a média das dimensões (nm) do capsídeo e cauda de cada um dos bacteriófagos isolados, bem como o formato do capsídeo (icosaedro regular ou alongado) e o tipo de cauda (longa e contrátil, longa, estreita/espessa e flexível ou curta).

5.3 Espectro de hospedeiro

As curvas de crescimento das bactérias testadas na presença dos diferentes bacteriófagos isolados são apresentadas na Figura 3. Os fagos Eco1, Eco2 e Eco3 foram capazes de infectar tanto *E. coli* 30 quanto *E. coli* K12-80, provocando placas de lises na superfície do meio de cultura na presença dessas bactérias quando plaqueadas pela técnica da dupla camada. Além disso, esses fagos impediram o crescimento da população de *E. coli* 30 até aproximadamente 6 h de cultivo ($t = 350$ min), enquanto no controle (ausência de fago) a população bacteriana começou a crescer logo após a inoculação, atingindo a fase estacionária (platô) com aproximadamente 5 h ($t = 300$ min) (Fig. 3A). Por outro lado, na presença dos fagos Eco1, Eco2 e Eco3 essa fase só foi alcançada após aproximadamente 18 h de cultivo ($t = 1100$ min), resultando ainda em uma suspensão com D.O. final mais baixa que a D.O. da suspensão de bactérias no controle ($p < 0,05$).

O fago Eco4, isolado de *E. coli* SAN3, causou uma drástica inibição do crescimento da população de sua hospedeira, que só voltou a crescer na presença do fago após aproximadamente 10 h de cultivo ($t = 650$ min) (Fig. 3B). Mesmo com esse crescimento, na presença desse fago a suspensão de bactérias apresentou D.O₆₀₀ máxima muito inferior à bactéria controle ($p < 0,05$). Fago Eco4 provocou também uma

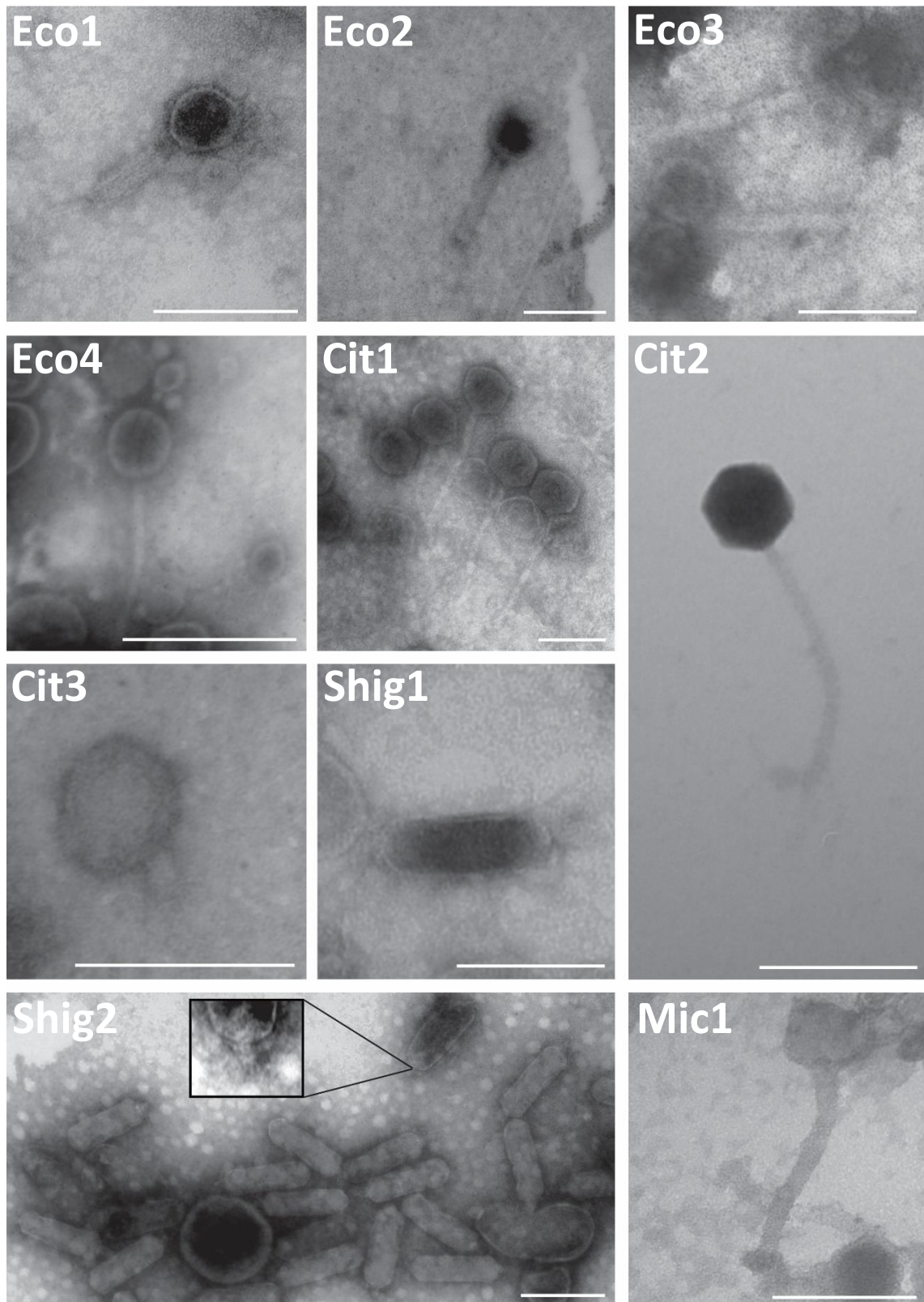


Figura 2. Microscopia eletrônica de transmissão dos bacteriófagos isolados Eco1, Eco2, Eco3, Cit1, Cit2, Cit3, Shig1, Shig2 e Mic1. As barras representam 100 nm, com exceção de Eco3, em que a barra representa 200 nm.

Tabela 5. Dimensões médias (nm), formato do capsídeo e tipo de cauda dos bacteriófagos isolados.

Isolado	Dimensões médias, nm			Formato do capsídeo	Tipo de cauda
	Diâmetro do capsídeo	Comprimento da cauda	Tamanho total		
Eco1	62	100	162	Icosaedro regular	Longa, contrátil
Eco2	70	105	175	Icosaedro regular	Longa, contrátil
Eco3	100	ND	ND	Icosaedro regular	Longa
Eco4	57	126	183	Icosaedro regular	Longa, estreita, flexível
Cit1	68	188	256	Icosaedro regular	Longa, estreita, flexível
Cit2	55	200	255	Icosaedro regular	Longa, estreita, flexível
Cit3	60	18	78	Icosaedro regular	Curta
Shig1	115	10	125	Icosaedro alongado	Curta
Shig2	100	10	110	Icosaedro alongado	Curta
Mic1	72	168	235	Icosaedro regular	Longa, espessa, flexível

ND: Não determinado.

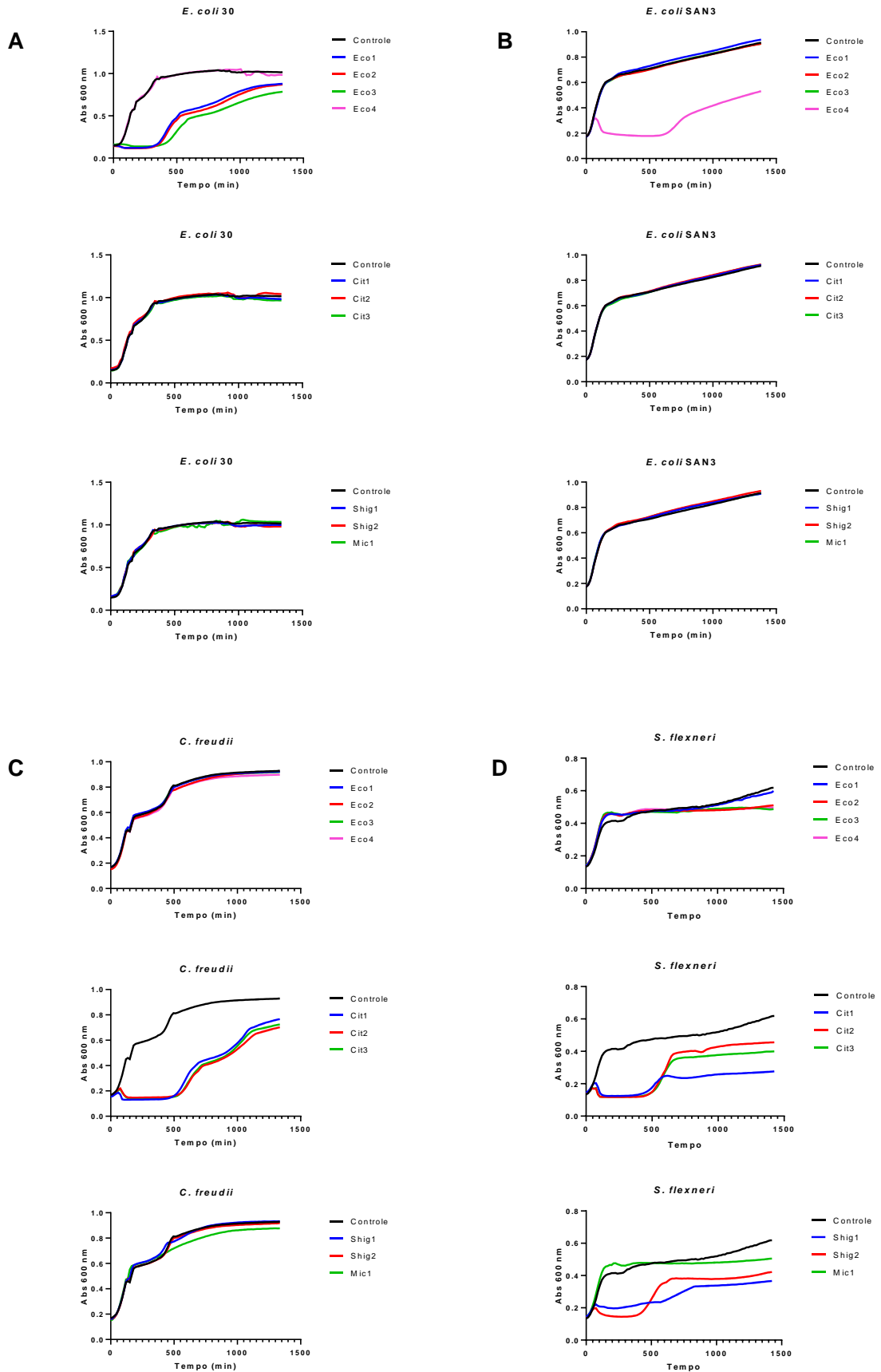
“perturbação” no teste de gotejamento em *E. coli* 30, caracterizada por halos turvos de lise celular. Porém, quando plaqueado pela técnica de dupla camada o fago não causou placas de lise nessa bactéria. Os fagos Cit1, Cit2 e Cit3 impediram o crescimento da população de *C. freundii* até aproximadamente 8 h de incubação (t=

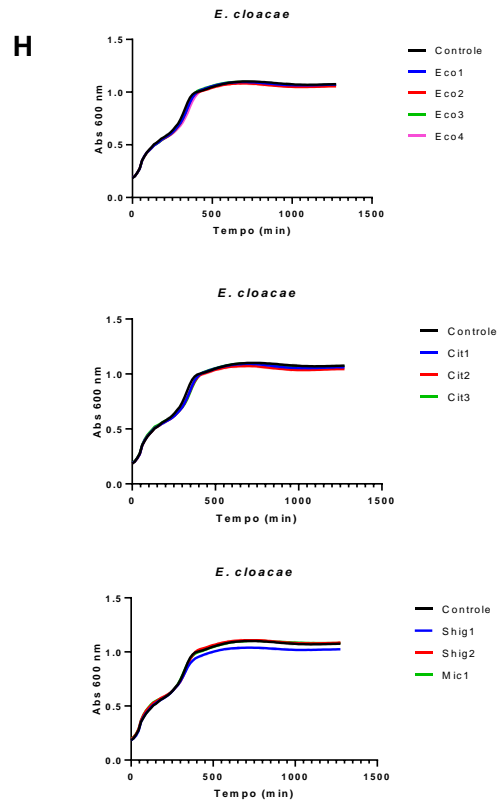
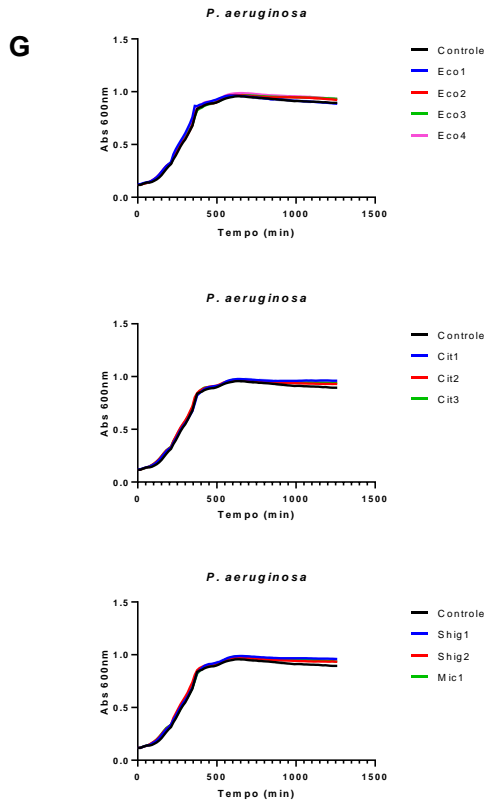
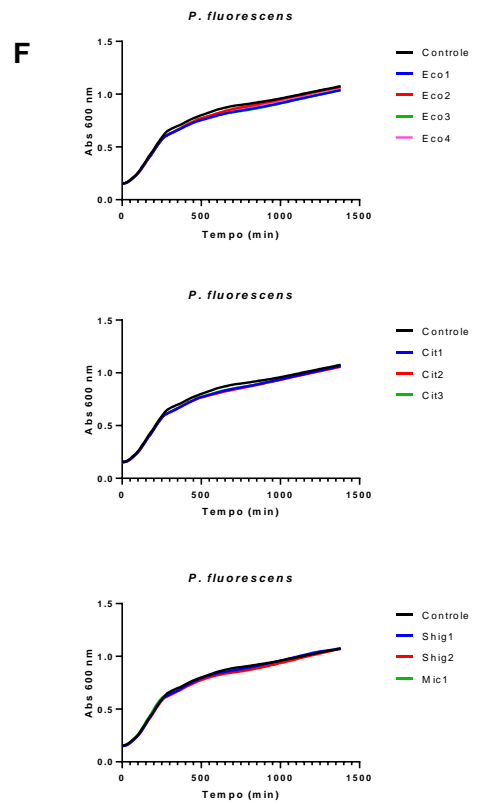
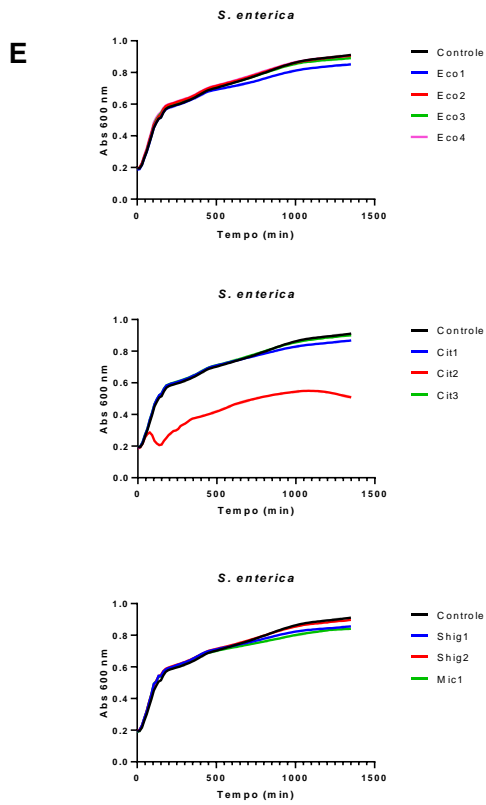
500 min) (Fig. 3C). Após esse período a população voltou a crescer e atingiu a fase estacionária. No entanto, a suspensão bacteriana nessa fase estacionária apresentou D.O mais baixa que a D.O da suspensão de bactéria nos poços controle ($p < 0,05$). Esses fagos também foram capazes de infectar *S. flexneri* (Fig. 3D). Cit2 e Cit3 provocaram alterações nas curvas de *S. flexneri* de forma semelhante às alterações observadas para *C. freundii*, com inibição do crescimento da população até aproximadamente 8 h de incubação ($t = 500$ min) e fase estacionária caracterizada por suspensão bacteriana de D.O mais baixa que a D.O da suspensão de bactérias nos poços controle ($p < 0,05$). Também na presença do fago Cit1, a população de *S. flexneri* teve seu crescimento inibido por aproximadamente 8 h, voltando a crescer após esse período. No entanto esse crescimento foi baixo e inibido novamente pela presença do fago alguns minutos depois. Interessantemente, o isolado Cit2 foi capaz de infectar um terceiro hospedeiro, *S. enterica* (Fig. 3E). Além de reduzir pela metade a D.O₆₀₀ máxima da suspensão bacteriana alcançada na fase log de crescimento, esse isolado foi capaz de provocar placas de lise em culturas inoculadas com *S. enterica*.

Os fagos Shig1 e Shig2 foram capazes de infectar apenas o hospedeiro de isolamento, *S. flexneri* (Fig. 3D), não reduzindo a curva de crescimento de nenhuma outra bactéria testada. Os fagos Shig1 e Shig2 impediram o crescimento da população da sua hospedeira até aproximadamente 9 h ($t = 550$ min) e 6 h ($t = 400$ min) de cultivo respectivamente. Após esse tempo, a população de bactérias voltou a crescer, mas em ambos os tratamentos com o fago a D.O₆₀₀ máxima da suspensão, alcançada na fase log de crescimento da população, foi reduzida em relação a D.O₆₀₀ máxima da suspensão no controle ($p < 0,05$).

O fago Mic1, único isolado de bactéria gram-positiva, além de inibir quase completamente o crescimento da população da sua hospedeira (*M. luteus*) (Fig. 3K), foi capaz de reduzir também a curva de crescimento *B. cereus* (Fig. 3I). Nessa última população de bactérias, a presença do fago provocou um crescimento bacteriano até aproximadamente 4 h de cultivo ($t = 250$ min), seguido por um longo período de ausência do crescimento (até 20 h) e novamente uma retomada do aumento populacional. Em contraste, na população controle o crescimento aconteceu até aproximadamente 11 h de cultivo ($t = 700$ min). Apesar das alterações provocadas na curva de crescimento de *B. cereus*, Mic1 não provocou lise nas células dessa bactéria quando plaqueada com o fago. Nenhum dos fagos isolados causou redução ou retar-

Espectro de hospedeiro





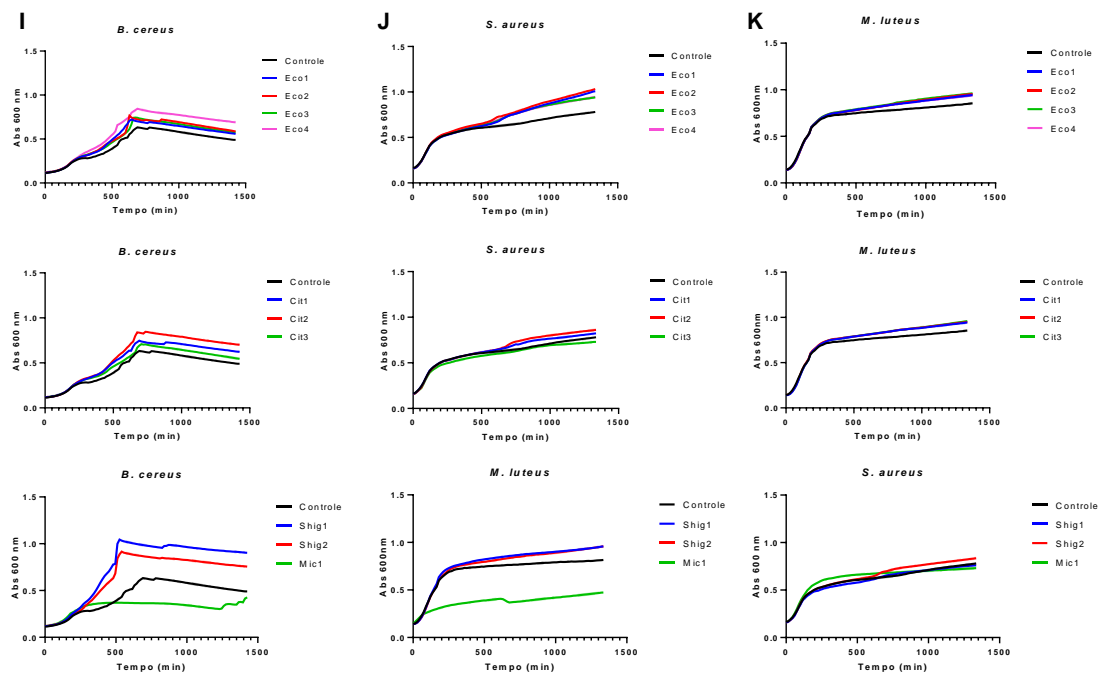


Figura 3. Curvas de crescimento das bactérias A) *Escherichia coli* 30, B) *Escherichia coli* SAN3, C) *Citrobacter freundii*, D) *Shigella flexneri*, E) *Salmonella enterica*, F) *Pseudomonas fluorescens*, G) *Pseudomonas aeruginosa*, H) *Enterobacter cloacae* I) *Bacillus cereus*, J) *Staphylococcus aureus*, e K) *Micrococcus luteus*, representando o espectro de hospedeiro dos fagos isolados. A linha controle (preto) representa o crescimento das bactérias na ausência dos fagos. As linhas coloridas representam o crescimento das bactérias inoculadas com os fagos (10^7 UFP/mL).

-damento da curva de crescimento de *P. fluorescens* (Fig. 3F), *P. aeruginosa* (Fig. 3G), *E. cloacae* (Fig. 3H) e *S. aureus* (Fig. 3J).

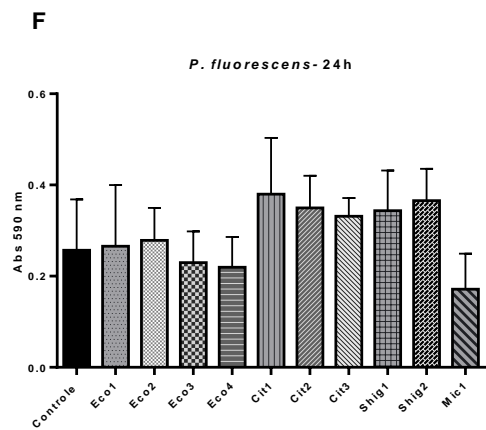
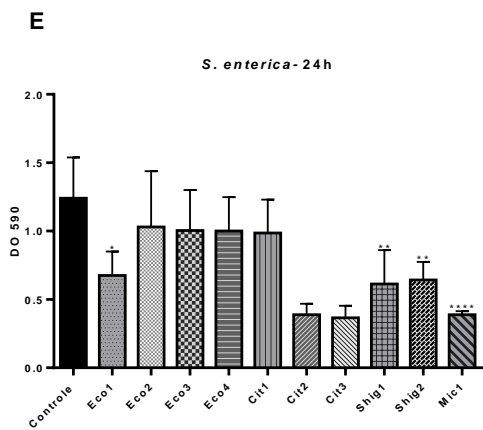
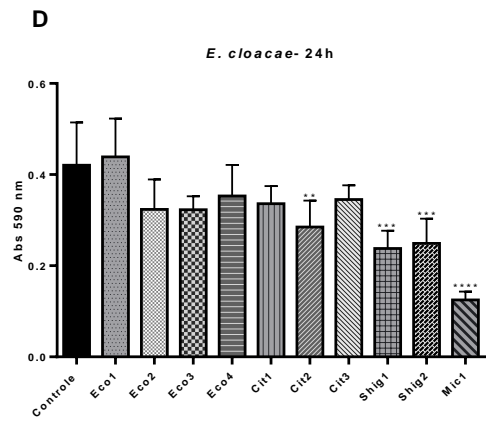
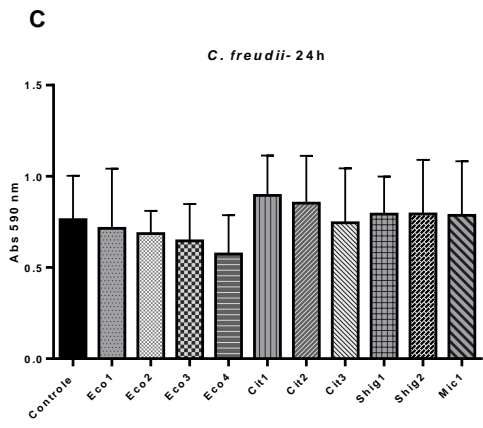
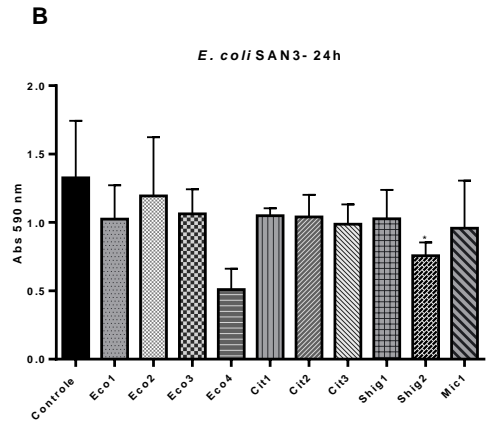
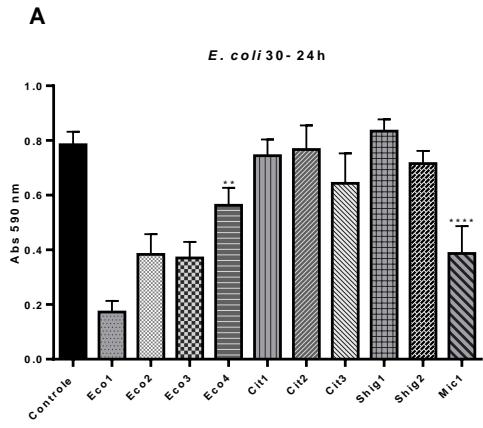
O fago Mic1, único isolado de bactéria gram-positiva, além de inibir quase completamente o crescimento da população da sua hospedeira (*M. luteus*) (Fig. 3K), foi capaz de reduzir também a curva de crescimento *B. cereus* (Fig. 3I). Nessa última população de bactérias, a presença do fago provocou um crescimento bacteriano até aproximadamente 4 h de cultivo ($t = 250$ min), seguido por um longo período de ausência do crescimento (até 20 h) e novamente uma retomada do aumento populacional. Em contraste, na população controle o crescimento aconteceu até aproximadamente 11 h de cultivo ($t = 700$). Apesar das alterações provocadas na curva de crescimento de *B. cereus*, Mic1 não provocou lise nas células dessa bactéria quando plaqueada com o fago. Nenhum dos fagos isolados causou redução ou retardamento da curva de crescimento de *P. fluorescens* (Fig. 3F), *P. aeruginosa* (Fig. 3G), *E. cloacae* (Fig. 3H) e *S. aureus* (Fig. 3J).

Em contraste com a redução da curva de crescimento, a presença de alguns fagos também provocou aumento do crescimento da população de algumas bactérias. Esse fato foi mais marcante para *B. cereus*, onde todos os fagos, exceto Mic1, provocou um aumento do crescimento populacional ($p < 0,05$). Além de *B. cereus*, *S. aureus* também teve sua população aumentada na presença dos fagos Eco1, Eco2, Eco3, Eco4, Shi1 e Shig2 ($p < 0,05$).

5.4 Quantificação da biomassa total do biofilme formado por bactérias aeróbias

Todos os fagos isolados foram capazes de provocar uma redução na quantificação da biomassa total de biofilme ($P \leq 0,05$) de pelo menos uma espécie bacteriana (Figura 4 e Tabela 6). Os gráficos que representam as quantificações de biomassa dos biofilmes das espécies bacterianas testadas são apresentados na Figura 4. Os fagos Shig2 e Mic1 foram os que tiveram efeito positivo na redução da formação do biofilme de um maior número de bactérias testadas. O fago Shig2 reduziu a formação de biofilme de 6 espécies, sendo elas *E. coli* SAN3 ($P=0,01$), *E. cloacae* ($P= 0,0004$), *S. enterica* ($P= 0,006$), *P. aeruginosa* ($P= 0,01$), *S. aureus* ($P= 0,0006$), e *M. luteus* ($P < 0,0001$), enquanto Mic1 reduziu a formação de biofilme em 5 espécies, sendo elas *E. coli* 30 ($P < 0,0001$), *E. cloacae* ($P < 0,0001$), *S. enterica* ($P < 0,0001$), *P. aeruginosa* ($P < 0,0001$) e *S. aureus* ($P < 0,0001$). O fago Shig1 teve efeito positivo no biofilme de 4 espécies: *E. cloacae* ($P= 0,0002$), *S. enterica* ($P=0,02$), *S. aureus* ($P=0,001$) e *M. luteus* ($P < 0,0001$). Os fagos Eco1, Eco4, Cit1 e Cit2 tiveram efeito sobre o biofilme de três espécies cada: Eco1 reduziu a formação do biofilme de *S. enterica* ($P= 0,01$), *S. aureus* ($P < 0,0001$) e *M. luteus* ($P < 0,0001$); Eco4 reduziu a formação do biofilme de *E. coli* 30 ($P= 0,006$), *S. aureus* ($P < 0,0001$) e *M. luteus* ($P < 0,0001$); Cit1 reduziu a formação do biofilme de *P. aeruginosa* ($P= 0,01$), *S. aureus* ($P= 0,0026$) e *M. luteus* ($P < 0,0001$); e Cit2 reduziu a formação do biofilme de *E. cloacae*, *S. aureus* ($P < 0,0001$) e *M. luteus* ($P < 0,0001$). Eco2 e Eco3 reduziram a formação do biofilme de *S. aureus* ($P < 0,0001$ e $P < 0,0001$ respectivamente) e *M. luteus* ($P=0,001$ e $P < 0,0001$, respectivamente). O fago Cit3 apresentou efeito apenas sobre o biofilme de *M. luteus* ($P=0,03$). O gráfico de biofilme de *S. flexneri* não foi apresentado devido à ausência de formação significativa de biofilme por essa bactéria.

A Tabela 6 apresenta um resumo do espectro de hospedeiro e da capacidade de redução da formação de biofilme dos bacteriófagos isolados.



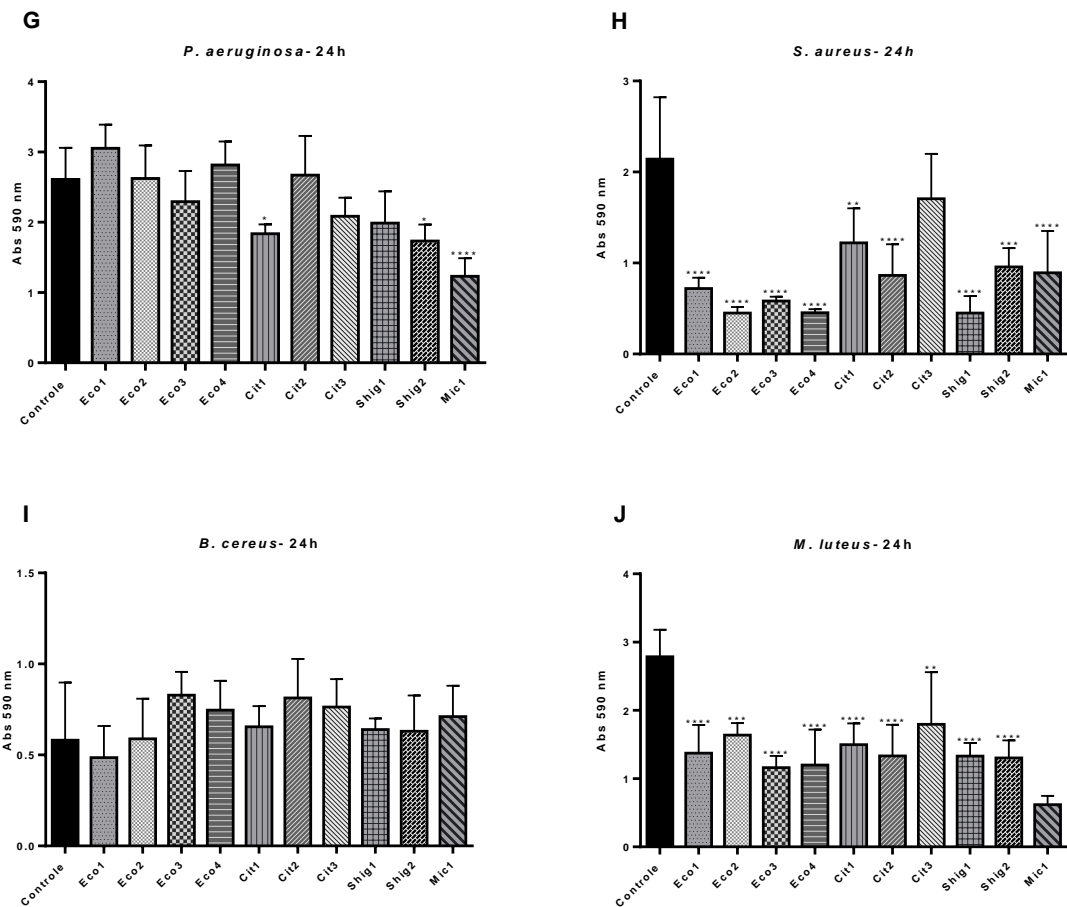


Figura 4. Quantificação de biomassa total nos biofilmes das bactérias aeróbias na ausência (controle) e presença dos fagos (1×10^7 UFP/mL), após período de incubação de 24 h em placas de 96 poços. A) *Escherichia coli* 30; B) *Escherichia coli* SAN3; C) *Citrobacter freundii*; D) *Shigella flexneri*; E) *Enterobacter cloacae*; F) *Salmonella enterica*; G) *Pseudomonas fluorescens*; H) *Pseudomonas aeruginosa*; I) *Bacillus cereus*; J) *Staphylococcus aureus*; e K) *Micrococcus luteus*. Os tratamentos estatisticamente significativos ($P \leq 0,05$) em relação ao controle são representados por * (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$).

5.5 Ação dos bacteriófagos isolados e em coquetéis sobre a formação de biofilme por uma cultura mista de bactérias redutoras de sulfato

Cinco dos 10 fagos isolados foram capazes de reduzir, de forma estatisticamente significativa ($P \leq 0,05$), a formação do biofilme pela cultura mista BRS47 (Figura 5), sendo eles dois fagos de *E. coli* (Eco1 e Eco2), um fago de *C. freundii* (Cit1) e os dois fagos de *S. flexnerii* (Shig1 e Shig2).

Dos 6 coquetéis testados, 3 foram capazes de reduzir ($P \leq 0,05$) a formação do biofilme pela cultura BRS47, sendo eles Coq3, Coq5 e Coq6 (Figura 6A). Esses mes-

Tabela 6. Espectro de hospedeiro dos fagos isolados e ação inespecífica no biofilme bacteriano.

Hospedeiro de isolamento	Fagos	<i>E. coli</i> 30	<i>E. coli</i> SAN3	<i>C. freundii</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>S. enterica</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>
<i>E. coli</i> 30	Eco1	X*	-	-	-	-	B	-	-	B	B	-
	Eco2	X*	-	-	-	-	-	-	-	B	B	-
<i>E. coli</i> K12-80	Eco3	X*	-	-	-	-	-	-	-	B	B	-
	Eco4	B	X*	-	-	-	-	-	-	B	B	-
<i>C. freundii</i>	Cit1	-	-	X	X	-	-	-	B	B	B	-
	Cit2	-	-	X	X	B	X*	-	-	B	B	-
	Cit3	-	-	X	X	-	-	-	-	B	-	-
<i>S. flexneri</i>	Shig1	-	-	-	X	B	B	-	-	B	B	-
	Shig2	-	B	-	X	B	B	-	B	B	B	-
<i>M. luteus</i>	Mic1	B	-	-	-	B	B	-	B	X	B	-

O "X" indica as bactérias usadas como hospedeira, o "X*" indica as bactérias hospedeiras que tiveram o biofilme reduzido pela presença do fago. O "B" indica a redução da formação do biofilme de bactérias não-hospedeiras pela presença do fago. O "-" indica que não houve redução significativa na curva de crescimento e biofilme pelos fagos testados.

-mos dados, apresentados em porcentagem na Figura 6B, demonstram uma eficiência de redução equivalente a 15% para o Coq3, 44% para o Coq5 e 43% para o Coq6. Os outros coquetéis, Coq1, Coq2 e Coq4, não alteraram de forma estatisticamente significativa o biofilme formado por essa cultura.

5.6 Testes de estabilidade

A habilidade dos fagos de resistirem às condições adversas é uma característica desejável nos agentes de biocontrole (THUNG *et al*, 2017). Assim, os testes de estabilidade foram conduzidos com os fagos usados para confecção dos coquetéis.

Todos os fagos foram capazes de manter a viabilidade em algum nível na faixa de pH de 4,0 – 12,0 (Figura 7). Em pH 10,0, todos os fagos apresentaram alta de resistência, mantendo de 70% a 100% das partículas virais viáveis. Por outro lado, após incubação em pH 4,0 a maioria dos fagos mostraram significativa diminuição no título, sendo que Cit1 e Cit2 mantiveram apenas 12% e 14%, respectivamente, de via-

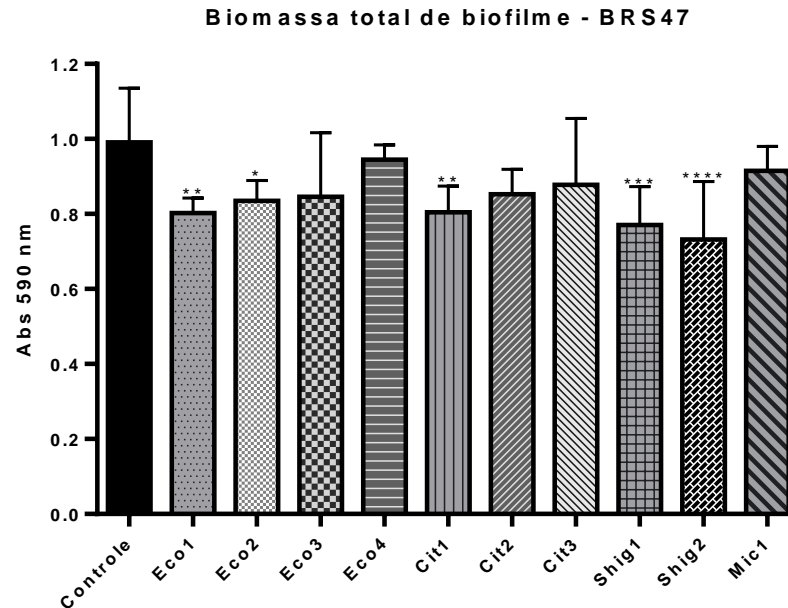


Figura 5. Quantificação de biomassa total no biofilme da cultura mista de BRS (BRS47) na ausência (controle) ou presença dos fagos (1×10^7 UFP/mL), após período de incubação de 5 dias em câmara de anaerobiose. Os tratamentos estatisticamente significativos ($P \leq 0,05$) em relação ao controle são representados por * ($*P < 0,05$; $**P < 0,01$, $***P < 0,001$ e $****P < 0,0001$).

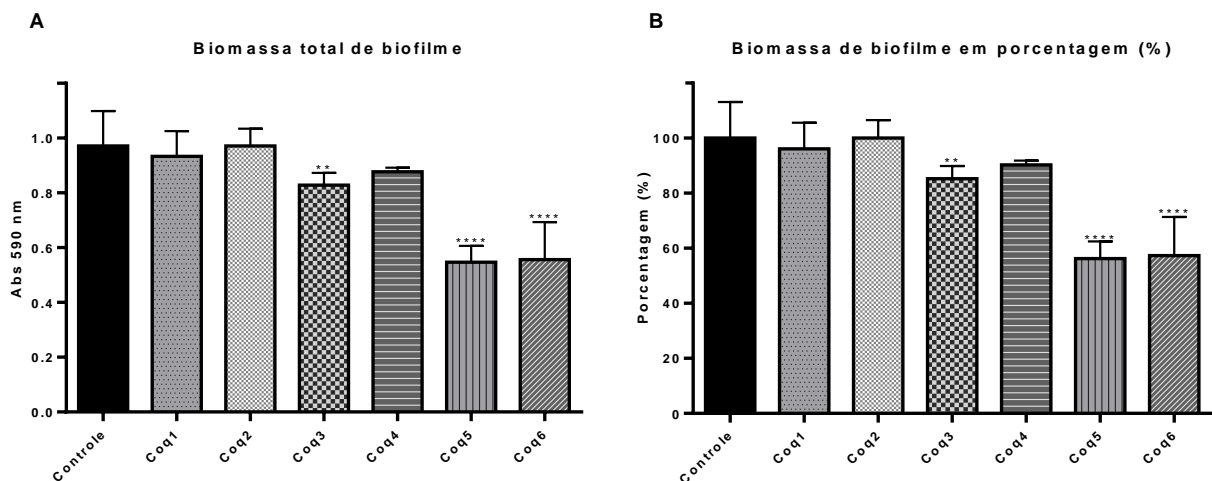


Figura 6. Quantificação de biomassa total no biofilme da cultura mista de BRS (BRS47) na ausência (controle) ou presença dos coquetéis fágicos (1×10^7 UFP/mL), após período de incubação de 5 dias em câmara de anaerobiose. O gráfico A representa os valores em Abs_{590nm} , enquanto o gráfico B representa os valores em porcentagem. Os tratamentos estatisticamente significativos ($P \leq 0,05$) em relação ao controle são representados por * ($**P < 0,01$ e $****P < 0,0001$).

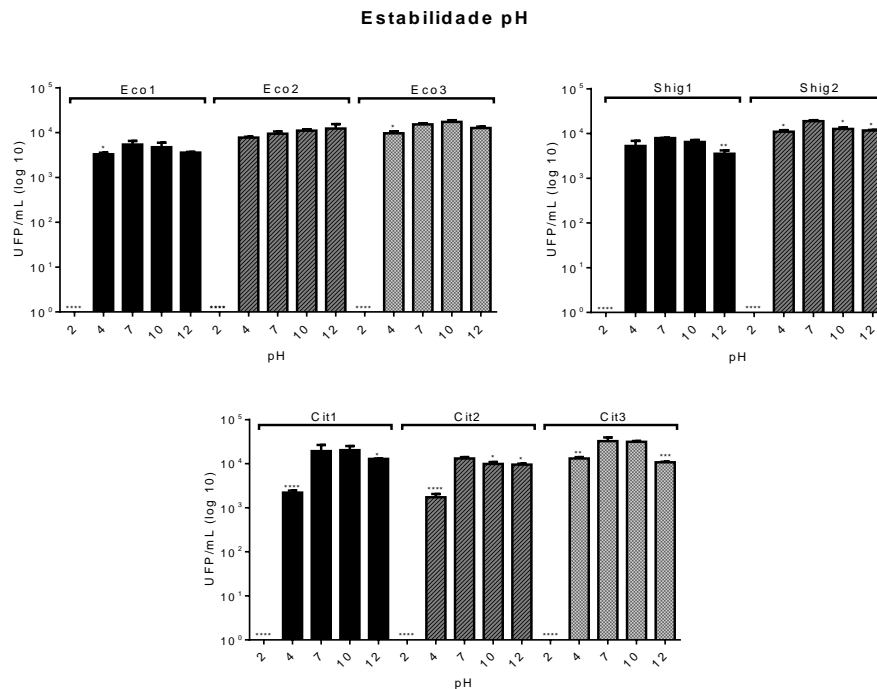


Figura 7. Estabilidade dos bacteriófagos nos diferentes valores de pH testados. A solução de bacteriófagos de pH 7 foi utilizada como controle (C). Os tratamentos estatisticamente significativos ($P \leq 0,05$) em relação ao controle (7) são representados por * (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$).

-bilidade viral. Apesar disso, todos os outros isolados mantiveram viabilidade acima de 50% nesse valor de pH, sendo Eco2 o único com alta capacidade de resistência (82% de partículas viáveis). Todos os fagos foram completamente inativados em pH 2,0, enquanto que em pH 12,0 todos resistiram, sendo que a maioria (Eco1, Eco2, Eco3, Cit1 e Cit2) manteve uma alta viabilidade das partículas virais (acima de 70%).

A inativação térmica (Figura 8) completa dos fagos ocorreu apenas na temperatura máxima testada de 80 °C. Nas temperaturas de 4 °C e 37 °C os fagos mantiveram-se estáveis, sem redução estatisticamente significativa da viabilidade viral. Na temperatura de -20 °C todos os fagos foram capazes de manter alguma viabilidade, porém apenas Cit1 apresentou alta resistência (70% de viabilidade viral). Os fagos Eco2, Eco3, Cit2 e Cit3 tiveram redução drástica do título após incubação nessa temperatura, com viabilidade viral inferiores a 5%. Quase todos os fagos mostraram-se sensíveis a temperatura de 55°C após incubação de 2 h, com exceção de Eco1 que manteve 100% da viabilidade. Em contraste, Cit1 manteve apenas 1% da viabilidade viral nessa mesma temperatura. Os fagos Eco3, Shig1 e Shig2 também

tiveram uma redução significativa do título quando incubados a 55 °C, mantendo apenas 20%, 16% e 10% da viabilidade viral, respectivamente.

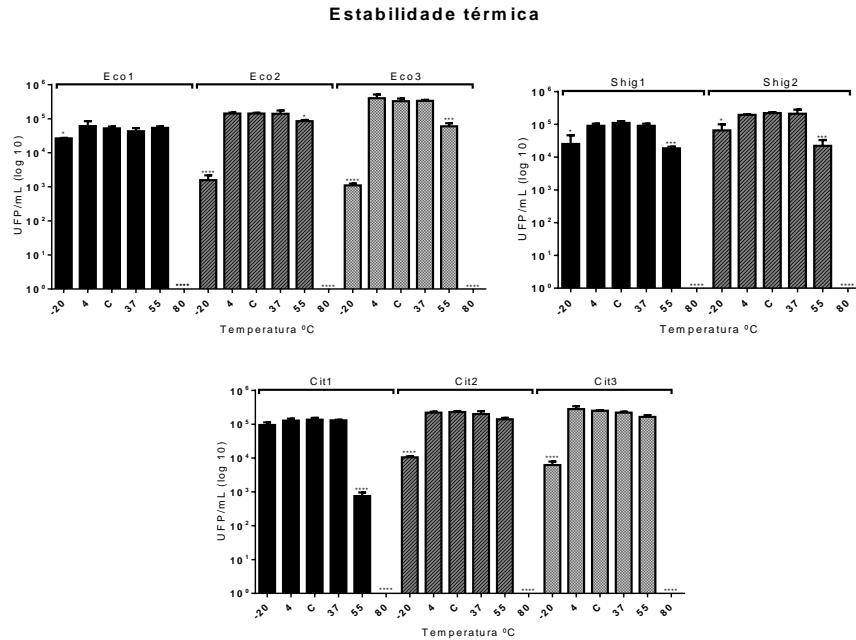


Figura 8. Estabilidade dos bacteriófagos nas diferentes temperaturas (°C) testadas. A solução de bacteriófagos incubada em temperatura ambiente (~25 °C) foi utilizada como controle (C). Os tratamentos estatisticamente significativos ($P \leq 0,05$) em relação ao controle (C) são representados por * ($P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$).

Em relação à estabilidade em água do mar, nenhum dos fagos testados apresentou redução significativa na viabilidade viral (Figura 9).

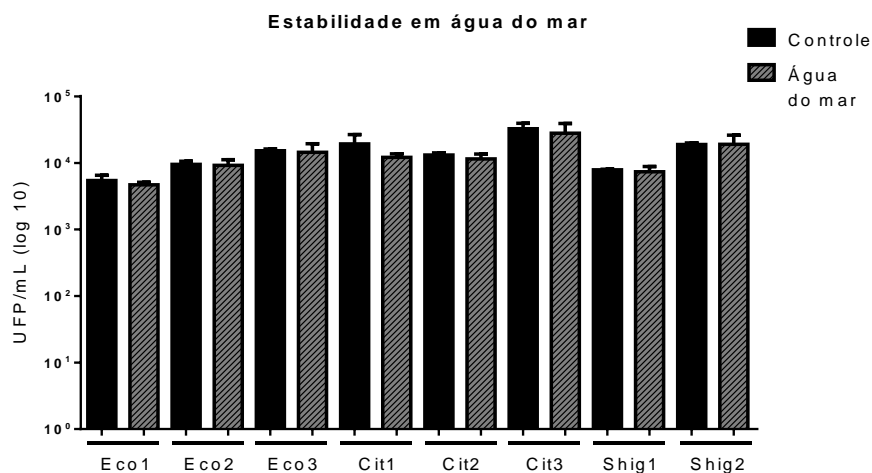


Figura 9. Estabilidade dos bacteriófagos em água do mar. Solução de bacteriófagos em meio LB foi utilizada como controle. Não houve tratamento estatisticamente diferente do controle.

5.7 Construção de um bacteriófago GFP recombinante

Após incubação das células bacterianas de *E. coli* SHuffle® transformadas com o plasmídeo foi possível notar algumas colônias na superfície da placa. Três colônias foram selecionadas e usadas como modelo nas reações de PCR para confirmação da presença do plasmídeo contendo o GFP e todas as três apresentaram resultado positivo.

As placas de lise resultantes dos fagos submetidos a recombinação homóloga foram analisadas em microscópio de fluorescência usando o canal para GFP. No entanto, a bactéria hospedeira do fago, *E. coli* 30, se mostrou fortemente autofluorescente nesse canal, o que atrapalhou a visualização de qualquer fago possivelmente recombinado e fluorescente. Apenas uma placa de lise apresentou fluorescência um pouco acima da fluorescência emitida pelo tapete bacteriano, e foi então recortada e propagada. Os fagos derivados da propagação dessa placa de lise foram chamados UFV09-R1, e apresentaram resultado positivo na reação de PCR usando os primers para confirmação do *gfp* (Figura 10). Além desse, outros três fagos derivados da seleção aleatória de placas de lise deram resultado positivo para a presença do *gfp*, sendo chamados UFV09-R2, UFV09-R3 e UFV09-R5 (Figura 10). Na imagem do gel de agarose (Figura 10) é possível perceber que foi gerado um amplicon de cerca de 700 pb para esses fagos e para o controle positivo (plasmídeo pUC57), tamanho correspondente ao *gfp*. Em comparação, não houve banda no fago UFV09 selvagem (UFV09-S).

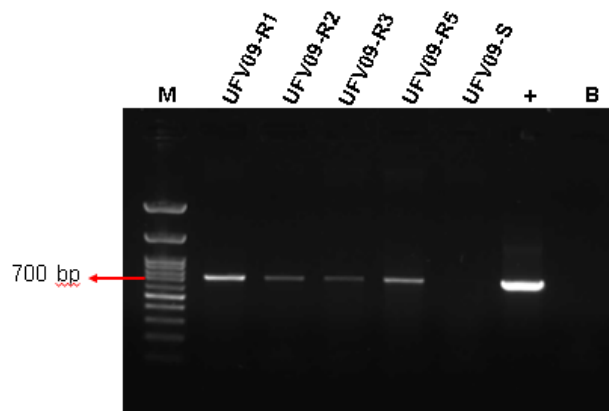


Figura 10. Gel de eletroforese em agarose confirmando a presença do gene *gfp* nos bacteriófagos recombinantes. Os amplicons de ~700 pares de base (pb) obtidos por PCR são referentes ao gene *gfp*. M: marcador de 100 pb. UFV09-R1, UFV09-R2, UFV09-R3 e UFV09-R5: fagos recombinantes. UFV09-S: fago selvagem. +: controle positivo (pUC57). B: branco.

Por PCR também foi possível verificar que o *gfp* não foi inserido no sítio desejado nos fagos recombinados. Os amplicons gerados usando os primers mcp/gfpF e gfp/vertexR foram de apenas 300 pares de base, correspondente ao amplicon do fago selvagem (Figura 11). A inserção do *gfp* no local desejado deveria gerar um amplicon de aproximadamente 1000 pb, como aconteceu no controle positivo (plasmídeo pUC57) (Figura 11). Isso mostra que o *gfp* não foi inserido no local desejado, ao final da MCP e seguido pela proteína Vertex.

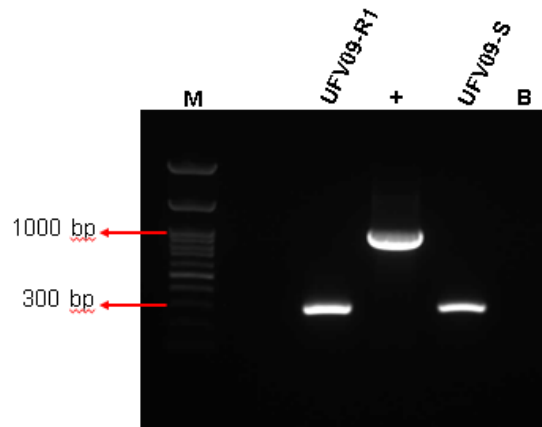


Figura 11. Gel de eletroforese em agarose dos amplicons gerados pelos *primers* mcp/gfpF e gfp/vertexR. Os amplicons de ~300 pares de base (pb) correspondem a região mcp/vertex sem o gene *gfp*. Os amplicons de ~1000 pares de base (pb) correspondem a região mcp/vertex com o gene *gfp*. M: marcador de 100 pb. UFV09-R1: fago recombinante. +: controle positivo (pUC57). UFV09-S: fago selvagem. B: branco.

Apesar das reações de PCR terem confirmado a presença do *gfp* no genoma dos fagos recombinados, as bactérias infectadas com esses fagos não se mostraram mais fluorescentes que as bactérias infectadas com o fago selvagem (UFV09-S). Sob o microscópio, a suspensão de células de *E. coli* 30 controle (sem infecção), infectadas com o fago selvagem e infectadas com os fagos recombinados emitiram praticamente a mesma intensidade de fluorescência. Esperava-se que os fagos recombinados tornassem as bactérias hospedeiras mais fluorescentes a medida que as infectasse e se multiplicassem (TANJI *et al.* 2004), pois mais cópias do GFP seriam produzidas junto com a proteína constitutiva do capsídeo (MCP), o que produziria um aumento na emissão de fluorescência por essas bactérias infectadas. É possível que a inserção do *gfp* em outro lugar do genoma pode ter atrapalhado o dobramento correto da proteína GFP, impedindo que ela fosse capaz de emitir a

fluorescência desejada.

Além disso, a região escolhida para a inserção do GFP pode não ter sido a mais adequada. A proteína principal do capsídeo (*Major Capsid Protein – MCP*) foi escolhida devido ao fato de ela ser a proteína do capsídeo produzida com maior número de cópias, 960 no total (RAO e BLACK, 2010). Dessa forma, esperávamos obter uma intensidade de fluorescência maior devido ao grande número de cópias de GFP que seriam produzidas juntamente com a MCP. No entanto, MCP, como o próprio nome já diz, é a proteína principal do capsídeo, e seu dobramento e montagem correta é de extrema importância na manutenção da estrutura capsídeo (RAO e BLACK, 2010). Assim, é possível que a inserção do *gfp* no genoma possa ter interrompido ou alterado a expressão de algum gene importante do fago, visto que os fagos recombinados perderam a estabilidade após algumas semanas de armazenamento.

É possível ainda que alguns fagos tenham sido recombinados de forma correta. No entanto, sem um método de triagem eficiente na detecção dos fagos recombinantes, encontrar o clone desejado é bastante laborioso, visto a baixíssima taxa de recombinantes normalmente obtidas pelo método de recombinação homóloga (PIRES *et al.*, 2016). Métodos de seleção como aqueles baseado no sistema CRISPR-Cas já demonstraram alta eficiência na seleção dos fagos recombinados, e poderia ser uma ferramenta interessante nesse caso.

Outros trabalhos obtiveram sucesso na produção de fagos recombinados pela fusão de GFP à proteínas decorativas não essenciais do capsídeo, a Soc (small outer capsid protein) e Hoc (highly antigenic outer capsid protein). Essas proteínas são dispensáveis, e se ligam ao capsídeo depois da sua completa montagem (RAO e BLACK, 2010). Dessa forma, mutações nos genes que codificam essas proteínas não afetam a produção de novas partículas fágicas, bem como sua viabilidade ou infectividade (RAO e BLACK, 2010). Análises do genoma do fago UFV09 mostram que ele não possui o gene que codifica a Soc e, apesar de possuir gene para a Hoc essa é uma proteína que produz poucas cópias em comparação com a MCP (960) e a Soc (870). Devido a isso, o gene da Hoc poderia ser fusionado com mais de uma cópia do *gfp*, aumentando assim o número de cópias de GFP e possivelmente aumentando o sinal de fluorescência (Møller-Olsen *et al.*, 2018).

6. DISCUSSÃO

Nesse trabalho, 10 bacteriófagos líticos foram isolados de amostras oriundas da rede de esgoto, uma tradicional para o isolamento de novos vírus (ACKERMANN, 2003; BHATTACHARJEE *et al.* 2015). A análise microscópica dos fagos isolados revelou morfologias características de miovírus, sifovírus e podovírus. O fago Mic1 foi o único que deixou dúvidas quanto ao morfotipo. A cauda muito longa e flexível desse isolado faz parecer que ele seja um sifovírus. No entanto, sua cauda é também espessa, sugerindo a presença de uma bainha da cauda, estrutura característica de miovírus. Além disso, miovírus líticos de *B. cereus* como o SPO1 e bacteriófagos relacionados com SPO1 apresentam morfologia muito semelhante à de Mic1, com capsômeros conspícuos e uma longa cauda, espessa e estriada (140 – 219 nm de comprimento) que possui estruturas globulares na ponta (KLUMPP *et al.*, 2010; GILLIS e MAHILLON, 2014). Análises moleculares futuras, como sequenciamento do genoma, deverão ser conduzidas com esse e outros fagos a fim de classificá-los taxonomicamente em níveis inferiores ao de ordem. Interessantemente, ambos os fagos isolados de *S. flexneri*, Shi1 e Shig2, apresentaram morfologia de podovírus do tipo C3. Bacteriófagos com o morfotipo C3 são caracterizados por cabeças muito longas (cerca de 90-223 nm de comprimento) que excedem em várias vezes sua largura (ACKERMANN, 1998). Este morfotipo é extremamente raro entre os podovírus, sendo relatados na infecção de dois grupos distantemente relacionados de bactérias: bactérias entéricas gram-negativas e lactococos gram-positivos (ACKERMANN, 2001; ACKERMANN, 2007; CHOPIN *et al.*, 2007; MIRZAEI *et al.*, 2014; PUNIL *et al.*, 2019; REN *et al.*, 2019). Punil *et al.* (2019) relatou o isolamento de um fago morfotipo C3 lítico para *E. coli* que também foi capaz de infectar *S. sonnei*. No entanto, ainda não havia sido relatado nenhum podovírus com esse morfotipo capaz de infectar *S. flexneri*.

No geral, os fagos isolados parecem ter uma gama estreita de hospedeiros, que é uma característica dos fagos já bem estabelecida (ACKERMANN, 2003). Para fins de terapia fágica uma gama de hospedeiros limitada a uma única espécie é, em muitos casos, desejável, pois evita que o fago lise outras espécies, deixando o restante da microbiota do hospedeiro intacta (HYMAN, 2019). No entanto, os fagos Cit1, Cit2 e Cit3, demonstraram que o espectro de hospedeiro dos fagos não é sempre restrito a gênero, e suporta as evidências que bacteriófagos de ampla gama de hospedeiros

existem em fontes comuns de isolamento, como as águas residuárias (BIELKE *et al.*, 2007; PARRA e ROBESON, 2016; HAMDI *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2018; MAHMOUD *et al.*, 2018; MANOHAR *et al.*, 2019). Além disso, esses estudos sugerem que a polivalência é observada predominantemente entre os fagos que infectam enterobactérias, provavelmente devido a relação próxima entre os membros dessa família e exibição de receptores semelhantes. Estudos demonstram que o espectro de hospedeiro estendido de alguns fagos pode ser devido a aquisição de novos genes da fibra da cauda HAMDI *et al.* (2017). Também já foi demonstrado que a capacidade dos bacteriófagos de degradar componentes da cápsula de diferentes hospedeiros pode ser devido à presença de múltiplas depolimerases nas fibras da cauda (STUMMEYER *et al.*, 2006; PAN *et al.*, 2017). Como a cápsula também pode atuar como um receptor primário para bacteriófagos, que frequentemente possuem fibras ou espículas da cauda contendo atividades de despolimerização, a degradação da cápsula bacteriana permite que o fago obtenha acesso à superfície da célula hospedeira e se ligue ao receptor secundário (STUMMEYER *et al.*, 2006; RAKHUBA *et al.*, 2010). Ou seja, a presença de múltiplas depolimerases também pode estar relacionado à capacidade dos fagos de infectar múltiplos hospedeiros.

O fago Eco4 foi capaz de produzir uma perturbação em placas inoculadas com *E. coli* 30 mas não alterou sua curva de crescimento. De forma contrária, o fago Mic1 alterou a curva de *B. cereus* mas não causou placas de lise quando plaqueado com essa bactéria. Ambos os casos podem ser explicados pelo fenômeno de “*lysis-from-without*” (LO). Esse fenômeno é observado para alguns fagos *T-even*, e é caracterizado pela lise celular devido ao efeito direto de agentes extracelulares, e não por infecção fágica (multiplicação viral) (ABEDON, 2011). LO normalmente ocorre devido a dois fatores. O primeiro é a alta multiplicidade de adsorção viral. A lise bacteriana ocorre devido a penetração do fago no envelope celular durante a adsorção que, no caso de fagos T4, está relacionado a uma lisozima associada a cauda. Assim, quando um número substancial de fagos adsorve, ocorre um dano na parede celular suficiente para causar lise. O segundo é devido à ação de lisinas virais fornecidas exogenamente. As lisinas são enzimas líticas derivadas de fagos que degradam a parede celular e podem ser usadas para lisar bactérias gram-positivas “de fora” (ABEDON, 2011). Estudos futuros devem ser conduzidos para investigar se as alterações causadas por Eco4 e Mic1 em *E. coli* 30 e *B. cereus*, respectivamente, são realmente devido a LO.

A curva de crescimento das bactérias hospedeiras mostraram que após algumas ou várias horas houve um crescimento celular significativo mesmo na presença de um fago lítico específico, indicando o surgimento de células resistentes à infecção ou a ocorrência de um estado de lisogenia. Bactérias podem resistir à infecção fágica através de diferentes mecanismos, sendo o mais comum a ausência, perda ou alteração (p. ex. mutações espontâneas) dos componentes da superfície bacteriana que agem como receptores para os fagos (LABRIE *et al.*, 2010; OECHSLIN, 2018). No entanto, mudança nos fatores de virulência de superfície podem tornar a bactéria resistente ao fago menos virulenta e mais susceptível a antibióticos (GERMAN e MISRA, 2001; LABRIE *et al.*, 2010; LEÓN e BASTÍAS, 2015). Assim, dentre as estratégias que podem ser usadas para prevenir a resistência ou aumentar a eficácia do tratamento tem-se a combinação de fagos com produtos químicos antimicrobianos compatíveis, e/ou o uso de coquetéis fágicos (LEVERENTZ *et al.*, 2003; TORRES-BARCELÓ e HOCHBERG, 2016; AGÚN *et al.*, 2018). A combinação de antimicrobianos (p. ex, biocidas e bacteriocinas) com bacteriófagos é uma estratégia promissora porque a frequência de desenvolvimento simultâneo de resistência a ambos os agentes bactericidas é muito menor do que apenas a resistência contra fagos ou desinfetantes (LEVERENTZ *et al.*, 2003; LU e COLLINS, 2009). Já o uso de coquetéis pode ampliar o espectro de hospedeiros atingidos, de forma que os diferentes fagos presentes no coquetel tenham uma sinergia ao alvejarem diferentes receptores na superfície da bactéria, resultando em menor chance estatística de co-resistência bacteriana (GU *et al.*, 2012; OECHSLIN, 2018).

Uma vez que biofilmes bacterianos representam ameaças consideráveis ao setor sanitário e também industrial (HARADA *et al.*, 2018), a capacidade dos fagos isolados de reduzirem a formação do biofilme de diferentes espécies patogênicas e problemáticas (por exemplo as formadoras de biofilme, as que causam corrosão, etc.) torna-os promissores agentes de biocontrole para aplicações além da indústria petrolífera. O fago Shig2 e Mic1, por exemplo, foram capazes de reduzir a formação do biofilme por uma variedade de bactérias, dentre eles biofilmes de difícil controle de bactérias distantemente relacionadas, como a gram-negativa *P. aeruginosa* e a gram-positiva *S. aureus*. Esses microrganismos são patógenos resistentes a diversos antibióticos e desinfetantes, e as propriedades únicas do biofilme complicam ainda mais a sua erradicação, levando ao desenvolvimento de infecções crônicas (LEE e YOON, 2017; OKUDA *et al.*, 2013).

Os fagos Shig2 e Mic1, assim como Shig1, Eco1, Cit1 e Cit2, também foram capazes de reduzir a formação do biofilme por espécies que, além de provocarem doenças, causam grandes perdas no setor alimentício, como *E. cloacae* e *S. enterica*. Os biofilmes desses patógenos podem gerar uma fonte persistente de contaminação, levando a sérios problemas de infecção de origem alimentar e também perdas econômicas devido à deterioração dos alimentos (BROOKS *et al.*, 2008). A limpeza é a principal forma de controle de biofilmes no setor alimentício, no entanto muitos dos compostos de limpeza usados nesse setor não são projetados primeiramente para remover biofilmes (BROOKS *et al.*, 2008; MERINO *et al.*, 2019). Além disso, os biofilmes de *Salmonella* spp. são resistentes a diversos desinfetantes e antibióticos (MERINO *et al.*, 2019). Assim, até o momento, a melhor estratégia para erradicar biofilmes bacterianos de ambientes relacionados a alimentos é prevenir sua formação (COUGHLAN *et al.*, 2016).

Nesse trabalho, observou-se que os coquetéis formados por fagos isolados de diferentes hospedeiros (Coq5 e Coq6) foram mais efetivos em reduzir a formação do biofilme de uma cultura mista de BRS, a BRS47, que os respectivos fagos agindo de forma isolada e que os coquetéis formados por fagos isolados do mesmo hospedeiro. Dessa forma, além de aumentar o espectro de hospedeiro e evitar a resistência bacteriana, o uso de coquetéis pode aumentar a eficiência do controle de biofilmes através do efeito sinérgico das diferentes depolimerases (e outras enzimas associadas à vírion) presentes nos fagos que compõem o coquetel (JIA *et al.*, 2019). Assim, em vez de lisar células bacterianas, a remoção de polissacarídeos pode levar à ruptura ou desestruturação da matriz do biofilme, liberando as células aderidas a matriz para a fase planctônica e permitindo a sua fácil remoção (SALMOND e FINERAN, 2015).

O fago Shig1 é comum aos três coquetéis capazes de reduzir a formação do biofilme pela BRS47, o que sugere um importante papel desse isolado sobre o biofilme dessa cultura. Esse fago, um podovírus, também foi capaz de reduzir a formação do biofilme por diferentes espécies bacterianas (*E. cloacae*, *S. enterica*, *S. aureus* e *M. luteus*). Interessantemente, o fago que teve ação sobre o maior número de biofilmes bacterianos foi o outro podovírus isolado de *S. flexneri*, Shig2. As depolimerases mais amplamente estudadas são derivadas de podovírus, levantando a hipótese de que esses fagos podem depender mais dessas enzimas devido as suas caudas curtas e a dificuldade em alcançar o receptor interno do hospedeiro (KNECHT

et al., 2020). Nos últimos anos, no entanto, a pesquisa sobre enzimas semelhantes (mas não podovirais) está ganhando destaque. Aparentemente, bacteriófagos da família *Ackermannviridae*, *Myoviridae* e *Siphoviridae* apresentam múltiplas liases putativas, que aguardam caracterização adicional (KNECHT *et al.*, 2020).

Os fagos Eco1 e Eco2, presentes no coquetel 5 juntamente com Shig1, também parecem ter papel importante na redução da formação do biofilme da BRS47, visto que eles também estão presentes no coquetel 6, juntamente com Cit1 e Shig1. Além disso, como a BRS47 é uma cultura mista de composição desconhecida e Cit1 parece ser um fago com ampla gama de hospedeiro, é possível que Cit1 possa ter ação sobre algumas das bactérias presentes nessa cultura. Estudos futuros devem focar em investigar a composição dessa cultura a fim de conseguir estabelecer as relações entre seus integrantes e os fagos isolados.

Com relação aos testes de estabilidade, os resultados indicam a considerável estabilidade dos fagos em valores básicos pH no tempo testado (2 h) e estão de acordo com o trabalho de Jurczak-Kurek *et al.* (2016). Em um amplo estudo fisiológico utilizando 83 bacteriófagos isolados do esgoto, verificou-se que a grande maioria dos fagos eram capazes de permanecer viáveis por 1 h em valores de pH básicos (variando de 10 a 12) mas apresentavam um decréscimo significativo do título quando incubados pelo mesmo tempo em pH 4. Em pH 2, os autores verificaram que praticamente todos os fagos (com exceção um) eram completamente inativados após incubação de 1 h (JURCZAK-KUREK *et al.*, 2016). Esses autores também verificaram que a grande maioria dos 83 fagos isolados resistiram a incubações a -20 °C (12 h) e 40 °C (40 min), mas eram sensíveis à temperatura de 62 °C (40 min). Na maioria dos casos, o título dos fagos caiu significativamente após 40 min de incubação nessa última temperatura. Os autores também relatam que praticamente todos os fagos, com exceção de um, foram completamente inativados após 5 min de incubação a 95 °C.

Resultado semelhante foi obtido por Phothaworn *et al.* (2020), que ao testar a estabilidade térmica de dois fagos isolados de *Salmonella* relataram que ambos os fagos toleraram temperaturas de até 40 °C sem qualquer perda de infectividade, mas o número de partículas viáveis começou a diminuir significativamente em temperaturas acima de 50 °C. Além disso, os autores relataram que nenhum fago permaneceu viável após a incubação a 80 °C ou 90 °C. Com base em estudos dedicados à obtenção de partículas fágicas termoestáveis para fins biotecnológicos, foi sugerido que a resistência fágica a temperaturas mais altas se deve a formação de

ligações cruzadas de dissulfeto dentro das proteínas do capsídeo, que poderiam desempenhar um papel importante na estabilização do fago contra a desnaturação térmica (CALDEIRA *et al.*, 2007). Se esse é o caso do isolado Eco1 ainda precisa ser investigado.

A temperatura de -20 °C é normalmente utilizada para armazenamento. No entanto, os fagos podem ser armazenados a 4 °C sem qualquer perda de viabilidade. No caso da necessidade de armazenamento a -20 °C, crioprotetores como o glicerol 50% podem ser utilizados (MALIK *et al.*, 2017). Na indústria petrolífera, alguns poços podem atingir temperaturas elevadas (acima de 50 °C), o que inativaria todos os fagos. No entanto, a aplicação de coquetel com esses fagos poderia ser feita em tanques de armazenamento onde as temperaturas são mais baixas. Além disso, pH em torno de 4,0 normalmente são atingidos no momento da injeção de biocidas, que são ácidos e poderiam inativar alguns fagos. Como alternativa, poderia ser estudado a aplicação do coquetel em intervalos da aplicação do biocida, de forma que os dois não precisem ser aplicados ao mesmo tempo. Ainda, soluções alternativas de proteção dos fagos poderiam ser investigadas, como por exemplo o microencapsulamento (MALIK *et al.*, 2017).

Em relação à estabilidade em água do mar, nenhum dos fagos testados apresentou redução significativa na viabilidade viral. Phothaworn *et al.* (2020), testaram os dois fagos isolados de *Salmonella* quanto a sua viabilidade em diferentes concentrações de sal (0 – 3% de NaCl) por 1 h em temperatura ambiente e verificaram que não houve perda de infectividade. A estabilidade dos fagos em água do mar é uma característica interessante para aplicações envolvendo a indústria petrolífera, visto que a recuperação de petróleo “*offshore*” é feita pela injeção de água do mar nos poços.

Analisando a estabilidade individual dos fagos integrantes dos coquetéis promissores no controle do biofilme da BRS47, Coq5 e Coq6, percebe-se que apenas Eco1 e Eco2 foram altamente estáveis para praticamente todas as condições testadas (exceto a temperatura de -20 °C para o isolado Eco2). Shig1 teve considerável redução de título na temperatura de 55 °C, enquanto Cit1 teve grande redução de título na temperatura de 55 °C e no pH 4. Assim, em questão de estabilidade, Coq6, formado pelos isolados Eco1, Eco2 e Shig1, mostra-se mais promissor para ser usado como agente de biocontrole do biofilme dessa cultura. No entanto, testes de

estabilidade com os fagos juntos devem ser conduzidos, a fim de investigar se esses padrões se matêm.

Pesquisas futuras devem almejar expandir os conhecimentos a respeito dos fagos isolados a fim de saber mais a respeito de suas características biológicas básicas, como a cinética de multiplicação viral (*one-step growth curve*), e características moleculares. Através do sequenciamento de genoma buscaremos classificar cada isolado a nível de gênero e investigar a presença de genes de enzimas com potencial biotecnológico, genes de lisogenia e virulência, além da predição *in silico* de prováveis hospedeiros. Da mesma forma, deve-se fazer a identificação dos microrganismos presentes nas culturas mistas de BRS. Compreender as interações microbianas é importante para evitar consequências indesejadas e alcançar os resultados funcionais desejados.

Além disso, devemos fazer uma investigação mais aprofundada a respeito à estabilidade dos fagos que compõe os coquetéis, utilizando valores de pH e temperaturas não testadas, a fim de saber o ponto específico onde começa ocorrer a perda de estabilidade desses fagos. Por exemplo, os fagos tiveram perdas significativas de viabilidade em pH 4 e temperatura de 55 °C, mas em pH 5 e temperatura de 50 °C pode ser que eles se mantenham mais estáveis. Também é importante testar a estabilidade dos fagos na presença de biocidas.

Os métodos atuais de controle de biofilme nas indústrias de petróleo e gás incluem a remoção física e o tratamento com biocidas químicos. Embora esses métodos possam ser eficazes, a remoção incompleta do biofilme ou a má difusão de produtos químicos no biofilme podem permitir o recrescimento microbiano assim que o tratamento for interrompido (BALDWIN e SUMMER, 2012). Assim, a associação de coquetéis fágicos com produtos químicos pode ser uma alternativa interessante. À medida que os fagos agem sobre a matriz do biofilme, liberando as células aderidas, os produtos químicos passam a ter acesso a essas células, eliminando-as.

Em adição, deve-se investigar a eficácia dos coquetéis em condições mais próximas as de tanques, sob sistema de fluxo contínuo e em superfície metálica. Ao mesmo tempo, investigaremos a ação dos coquetéis e das novas combinações sobre outras culturas problemáticas de BRS de tanques e poços em ambientes relacionados à exploração e refino de petróleo. Por fim, pretendemos expandir o escopo de aplicação dos coquetéis pela promoção de novas combinações de fagos e aplicação em diferentes cenários.

7. CONCLUSÕES

Nesse trabalho, foi isolado 10 fagos líticos de amostras oriundas de esgoto, obtendo os principais representantes de bacteriófagos caudados (miovírus, sifovírus e podovírus), incluindo representantes raros como podovírus de morfotipo C3. Os fagos isolados mostraram capacidade de lisar várias bactérias patogênicas e oportunistas, bem como de reduzir a formação do biofilme de diferentes espécies. Além disso, a combinação e avaliação de fagos em formulações de coquetéis permitiu a obtenção de um coquetel promissor no controle do biofilme de uma cultura mista contendo bactérias redutoras de sulfato (BRS). A avaliação da estabilidade demonstrou que os fagos mantêm alta viabilidade em pHs básicos e temperaturas de 4 °C e 37 °C. Os fagos também permanecem estáveis em água do mar.

REFERÊNCIAS

- ABEDON, Stephen T. Lysis from without. **Bacteriophage**, v. 1, n. 1, p. 46-49, 2011.
- ABEDON, Stephen T. **Bacteriophages as drugs: the pharmacology of phage therapy**. Caister Academic Press, Norfolk, UK, 2014.
- ABEDON, Stephen T. Ecology of anti-biofilm agents II: bacteriophage exploitation and biocontrol of biofilm bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 8, n. 3, p. 559-589, 2015.
- ACKERMANN, Hans-W.; EISENSTARK, Abraham. The present state of phage taxonomy. **Intervirolgy**, v. 3, n. 4, p. 201-219, 1974.
- ACKERMANN, Hans-W. Tailed bacteriophages: the order Caudovirales. **Advances in virus research**, v. 51, p. 135-201, 1998.
- ACKERMANN, Hans-W. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. **Archives of virology**, v. 146, n. 5, p. 843-857, 2001.
- ACKERMANN, Hans-W. Bacteriophage observations and evolution. **Research in Microbiology**, v. 154, n. 4, p. 245-251, 2003.
- ADAMS, M. Bacteriophages. **Bacteriophages** 620 (1959).
- ACKERMANN, H.-W. 5500 Phages examined in the electron microscope. **Archives of virology**, v. 152, n. 2, p. 227-243, 2007.
- AGÚN, Seila *et al.* Study of the interactions between bacteriophage phiPLA-RODI and four chemical disinfectants for the elimination of *Staphylococcus aureus* contamination. **Viruses**, v. 10, n. 3, p. 103, 2018.
- AHMAD, Sajjad *et al.* An overview on phase variation, mechanisms and roles in bacterial adaptation. JPMA. **The Journal of the Pakistan Medical Association**, v. 67, n. 2, p. 285-291, 2017.
- BAKER, John R.; DONG, Shengli; PRITCHARD, David G. The hyaluronan lyase of *Streptococcus pyogenes* bacteriophage H4489A. **Biochemical Journal**, v. 365, n. 1, p. 317-322, 2002.
- BAKER, Brett J. *et al.* Related assemblages of sulphate-reducing bacteria associated with ultradeep gold mines of South Africa and deep basalt aquifers of Washington State. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 267-277, 2003.
- BALDWIN, D.; SUMMER, N. S. **Prevention and remediation of petroleum reservoir souring and corrosion by treatment with virulent bacteriophage**. Disponível em: <<https://www.google.com/patents/US8168419>>. Acesso em: 06 jun. 2021.
- BARTON, Larry L.; FAUQUE, Guy D. Biochemistry, physiology and biotechnology of sulfate-reducing bacteria. **Advances in applied microbiology**, v. 68, p. 41-98, 2009.

BEECH, I.B. Biocorrosion: role of sulphate-reducing bacteria. In **Encyclopaedia of Environmental Microbiology**, pp. 465-475, 2002.

BHATTACHARJEE, Ananda Shankar et al. Bacteriophage therapy for membrane biofouling in membrane bioreactors and antibiotic-resistant bacterial biofilms. **Biotechnology and bioengineering**, v. 112, n. 8, p. 1644-1654, 2015.

BIELKE, L. *et al.* Salmonella host range of bacteriophages that infect multiple genera. **Poultry Science**, v. 86, n. 12, p. 2536-2540, 2007.

BRIVES, Charlotte; POURRAZ, Jessica. Phage therapy as a potential solution in the fight against AMR: obstacles and possible futures. **Palgrave Communications**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2020.

BROOKS, John D.; FLINT, Steve H. Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. **International journal of food science & technology**, v. 43, n. 12, p. 2163-2176, 2008.

BULL, J. J.; OTTO, G.; MOLINEUX, I. J. In vivo growth rates are poorly correlated with phage therapy success in a mouse infection model. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 949-954, 2012.

CALDEIRA, Jerri C.; PEABODY, David S. Stability and assembly in vitro of bacteriophage PP7 virus-like particles. **Journal of nanobiotechnology**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2007.

CASJENS, Sherwood R. Comparative genomics and evolution of the tailed-bacteriophages. **Current opinion in microbiology**, v. 8, n. 4, p. 451-458, 2005.

CASTRO, Hector F.; WILLIAMS, Norris H.; OGRAM, Andrew. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 31, n. 1, p. 1-9, 2000.

CHADHA, Parul; KATARE, Om Prakash; CHHIBBER, Sanjay. In vivo efficacy of single phage versus phage cocktail in resolving burn wound infection in BALB/c mice. **Microbial pathogenesis**, v. 99, p. 68-77, 2016.

CHANG, Rachel Y. *et al.* Production of highly stable spray dried phage formulations for treatment of *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 121, p. 1-13, 2017.

CHATAIN-LY, Mai Huong. The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 51, 2014.

CHATURONGAKUL, Soraya; OUNJAI, Puey. Phage–host interplay: examples from tailed phages and Gram-negative bacterial pathogens. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 442, 2014.

CHHIBBER, Sanjay; KAUR, Tarsem; KAUR, Sandeep. Co-therapy using lytic bacteriophage and linezolid: effective treatment in eliminating methicillin resistant

Staphylococcus aureus (MRSA) from diabetic foot infections. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e56022, 2013.

CHHIBBER, Sanjay; BANSAL, Shruti; KAUR, Sukhmandir. Disrupting the mixed-species biofilm of *Klebsiella pneumoniae* B5055 and *Pseudomonas aeruginosa* PAO using bacteriophages alone or in combination with xylitol. **Microbiology**, v. 161, n. 7, p. 1369-1377, 2015.

CHOPIN, Alain *et al.* KSY1, a lactococcal phage with a T7-like transcription. **Virology**, v. 365, n. 1, p. 1-9, 2007.

CISEK, Agata Anna *et al.* Phage therapy in bacterial infections treatment: one hundred years after the discovery of bacteriophages. **Current microbiology**, v. 74, n. 2, p. 277-283, 2017.

COUGHLAN, Laura M. *et al.* New weapons to fight old enemies: novel strategies for the (bio) control of bacterial biofilms in the food industry. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1641, 2016.

DĄBROWSKA, Krystyna *et al.* Bacteriophages displaying anticancer peptides in combined antibacterial and anticancer treatment. **Future microbiology**, v. 9, n. 7, p. 861-869, 2014.

DANNENBERG, Simone *et al.* Oxidation of H₂, organic compounds and inorganic sulfur compounds coupled to reduction of O₂ or nitrate by sulfate-reducing bacteria. **Archives of Microbiology**, v. 158, n. 2, p. 93-99, 1992.

DA SILVA DUARTE, Vinícius *et al.* A T4virus prevents biofilm formation by *Trueperella pyogenes*. **Veterinary microbiology**, v. 218, p. 45-51, 2018.

DE ALMEIDA, Érica Santos Carvalho; FREIRE, Maria das Graças Machado; RABELO, Shirley Katyanne Lemos. Avaliação dos efeitos da presença de bactérias redutoras de sulfato em linhas de produção de petróleo na bacia de campos. **Perspectivas Online 2007-2011**, v. 3, n. 10, 2009.

D'HERELLE, M. Félix. Sur un microbe invisible antagoniste des bacillus dysenteriques. **Comptes rendus. Acad. Sci. Paris**, v. 165, p. 373-375, 1917.

DIAS, Roberto S. *et al.* The use of phage: therapy, biocontrol and commercial microbiology. **Bacteriophages: Biology, Applications and Role in Health and Disease**, p. 1-34, 2013.

DRULIS-KAWA, Zuzanna *et al.* Learning from bacteriophages-advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications. **Current Protein and Peptide Science**, v. 13, n. 8, p. 699-722, 2012.

DUFOUR, Nicolas *et al.* Phage therapy of pneumonia is not associated with an overstimulation of the inflammatory response compared to antibiotic treatment in mice. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 63, n. 8, p. e00379-19, 2019.

EMMERICH, Rudolf; LÖW, Oscar. Die künstliche Darstellung der immunisierenden Substanzen (Nucleasen-Immunitätsproteine) und ihre Verwendung zur Therapie der Infektionskrankheiten und zur Schutzimpfung an Stelle des Heilserums. **Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten**, v. 36, n. 1, p. 9-28, 1901.

ELSGAARD, Lars *et al.* Thermophilic sulfate reduction in hydrothermal sediment of Lake Tanganyika, East Africa. **Applied and environmental microbiology**, v. 60, n. 5, p. 1473-1480, 1994.

EYDAL, Hallgerd SC *et al.* Bacteriophage lytic to *Desulfovibrio aespoensis* isolated from deep groundwater. **The ISME journal**, v. 3, n. 10, p. 1139-1147, 2009.

FAUQUE, Guy D.; BARTON, Larry L. Hemoproteins in dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing prokaryotes. **Advances in Microbial physiology**, v. 60, p. 1-90, 2012.

FISH, Katherine E.; OSBORN, A. Mark; BOXALL, Joby. Characterising and understanding the impact of microbial biofilms and the extracellular polymeric substance (EPS) matrix in drinking water distribution systems. **Environmental science: water research & technology**, v. 2, n. 4, p. 614-630, 2016.

FISH, K.; OSBORN, A. M.; BOXALL, J. B. Biofilm structures (EPS and bacterial communities) in drinking water distribution systems are conditioned by hydraulics and influence discoloration. **Science of the Total Environment**, v. 593, p. 571-580, 2017.

FRUCIANO, Dottore Emiliano; BOURNE, Shawna. Phage as an antimicrobial agent: d'Herelle's heretical theories and their role in the decline of phage prophylaxis in the West. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 19-26, 2007.

GERMAN, Greg J.; MISRA, Rajeev. The TolC protein of *Escherichia coli* serves as a cell-surface receptor for the newly characterized TLS bacteriophage. **Journal of molecular biology**, v. 308, n. 4, p. 579-585, 2001.

GILLIS, Annika; MAHILLON, Jacques. Phages preying on *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*: past, present and future. **Viruses**, v. 6, n. 7, p. 2623-2672, 2014.

GOLKAR, Zhabiz; BAGASRA, Omar; PACE, Donald Gene. Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 02, p. 129-136, 2014.

GONZÁLEZ, Silvia *et al.* The behavior of *Staphylococcus aureus* dual-species biofilms treated with bacteriophage phiPLA-RODI depends on the accompanying microorganism. **Applied and environmental microbiology**, v. 83, n. 3, p. e02821-16, 2017.

GU, Jingmin *et al.* A method for generation phage cocktail with great therapeutic potential. **PloS one**, v. 7, n. 3, p. e31698, 2012.

GUTIÉRREZ, Diana *et al.* Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 825, 2016.

HALE, T. L.; KEUSCH, G. T. Shigella: structure, classification, and antigenic types. **Baron, The University of Texas Medical Branch at Galveston: Ch22**, 1996.
HAMDI, Sana *et al.* Characterization of two polyvalent phages infecting Enterobacteriaceae. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.

HANKIN, Ernest Hanbury. L'action bactericide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibrion du cholera. **Ann Inst Pasteur**, v. 10, n. 11, 1896.

HARADA, Liliam K. *et al.* Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. **Microbiological research**, v. 212, p. 38-58, 2018.

HARPER, D. R. *et al.* Bacteriophages and biofilms. *Antibiotics* 3: 270–284. 2014.

HÄUSLER, T. *Viruses vs. Superbugs, a Solution to the Antibiotic Crisis*. 2006.

HENRY, Marine; DEBARBIEUX, Laurent. Tools from viruses: bacteriophage successes and beyond. **Virology**, v. 434, n. 2, p. 151-161, 2012.

HOSSEINIDOUST, Zeinab; OLSSON, Adam LJ; TUFENKJI, Nathalie. Going viral: Designing bioactive surfaces with bacteriophage. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 124, p. 2-16, 2014.

HYMAN, Paul. Phages for phage therapy: isolation, characterization, and host range breadth. **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 1, p. 35, 2019.

IGNACIO-ESPINOZA, J. Cesar; SOLONENKO, Sergei A.; SULLIVAN, Matthew B. The global virome: not as big as we thought?. **Current opinion in virology**, v. 3, n. 5, p. 566-571, 2013.

JACKSON, Brendan R. *et al.* Outbreak-associated Salmonella enterica serotypes and food commodities, United States, 1998–2008. **Emerging infectious diseases**, v. 19, n. 8, p. 1239, 2013.

JENNISON, Amy V.; VERMA, Naresh K. Shigella flexneri infection: pathogenesis and vaccine development. **FEMS microbiology reviews**, v. 28, n. 1, p. 43-58, 2004.

JEANTHON, Christian *et al.* Thermodesulfobacterium hydrogeniphilum sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, sulfate-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent at Guaymas Basin, and emendation of the genus Thermodesulfobacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 765-772, 2002.

JEON, Jongsoo; YONG, Dongeun. Two novel bacteriophages improve survival in Galleria mellonella infection and mouse acute pneumonia models infected with extensively drug-resistant Pseudomonas aeruginosa. **Applied and environmental microbiology**, v. 85, n. 9, p. e02900-18, 2019.

JIA, Ru *et al.* Microbiologically influenced corrosion and current mitigation strategies: a state of the art review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 137, p. 42-58, 2019.

JURCZAK-KUREK, Agata *et al.* Biodiversity of bacteriophages: morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-17, 2016.

K CHAN, Benjamin; T ABEDON, Stephen. Bacteriophages and their enzymes in biofilm control. **Current pharmaceutical design**, v. 21, n. 1, p. 85-99, 2015.

KEEN, Eric Christopher. Phage therapy: concept to cure. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 238, 2012.

KIM, Minsik; RYU, Sangryeol. Spontaneous and transient defence against bacteriophage by phase-variable glucosylation of O-antigen in *S almonella enterica* serovar T yphimurium. **Molecular microbiology**, v. 86, n. 2, p. 411-425, 2012.

KIM, Shukho *et al.* Characterization of a *Salmonella* Enteritidis bacteriophage showing broad lytic activity against Gram-negative enteric bacteria. **Journal of Microbiology**, v. 56, n. 12, p. 917-925, 2018.

KLEIKEMPER, Jutta *et al.* Activity and diversity of sulfate-reducing bacteria in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 4, p. 1516-1523, 2002.

KLENK, Hans-Peter *et al.* The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. **Nature**, v. 390, n. 6658, p. 364-370, 1997.

KLUMPP, Jochen *et al.* The SPO1-related bacteriophages. **Archives of virology**, v. 155, n. 10, p. 1547-1561, 2010.

KNECHT, Leandra E.; VELJKOVIC, Marjan; FIESELER, Lars. Diversity and function of phage encoded depolymerases. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 2949, 2020.

KREMER, Mayara Kretzer *et al.* Detecção de bacteriófagos que infectam bactérias redutoras de sulfato em água de produção de um reservatório de petróleo "offshore". 2017.

KUCHMENT, Anna. **The Forgotten Cure: The Past and Future of Phage Therapy**. Springer Science & Business Media, 2011.

KUMARI, Seema; HARJAI, Kusum; CHHIBBER, Sanjay. Bacteriophage versus antimicrobial agents for the treatment of murine burn wound infection caused by *Klebsiella pneumoniae* B5055. **Journal of medical microbiology**, v. 60, n. 2, p. 205-210, 2011.

KUTTER, Elizabeth; SULAKVELIDZE, Alexander (Ed.). **Bacteriophages: biology and applications**. Crc press, 2004.

LABRIE, Simon J.; SAMSON, Julie E.; MOINEAU, Sylvain. Bacteriophage resistance mechanisms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 5, p. 317-327, 2010.

LETAROV, A. V.; KULIKOV, E. E. Adsorption of bacteriophages on bacterial cells. **Biochemistry (Moscow)**, v. 82, n. 13, p. 1632-1658, 2017.

LEE, Keehoon; YOON, Sang Sun. Pseudomonas aeruginosa biofilm, a programmed bacterial life for fitness. 2017.

LEUNG, Chung Yin Joey; WEITZ, Joshua S. Modeling the synergistic elimination of bacteria by phage and the innate immune system. **Journal of theoretical biology**, v. 429, p. 241-252, 2017.

LEVERENTZ, Britta *et al.* Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 8, p. 4519-4526, 2003.

LEVIN, Bruce R.; BULL, James J. Population and evolutionary dynamics of phage therapy. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 166-173, 2004.

LIAMLEAM, W., ANNACHHATRE A. P. Electron donors for biological sulfate reduction. **Biotechnol Adv**, v. 25, p.452–463, out. 2007.

LU, Timothy K.; COLLINS, James J. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 27, p. 11197-11202, 2007.

LU, Timothy K.; COLLINS, James J. Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 12, p. 4629-4634, 2009.

LWOFF, André; HORNE, Robert; TOURNIER, Paul. A system of viruses. In: **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 51-55, 1962.

MACIEJEWSKA, Barbara; OLSZAK, Tomasz; DRULIS-KAWA, Zuzanna. Applications of bacteriophages versus phage enzymes to combat and cure bacterial infections: an ambitious and also a realistic application?. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, n. 6, p. 2563-2581, 2018.

MADIGMAN, M. T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. 12 ed. Artmed: Porto Alegre, 2010.

MAHMOUD, Mayada *et al.* Isolation and characterization of polyvalent bacteriophages infecting multi drug resistant *Salmonella* serovars isolated from broilers in Egypt. **International journal of food microbiology**, v. 266, p. 8-13, 2018.

MALIK, Danish J. *et al.* Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy. **Advances in colloid and interface science**, v. 249, p. 100-133, 2017.

MANOHAR, Prasanth *et al.* Therapeutic characterization and efficacy of bacteriophage cocktails infecting *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter* species. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 574, 2019.

MARKINE-GORIAYNOFF, Nicolas *et al.* Glycosyltransferases encoded by viruses. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 10, p. 2741-2754, 2004.

MATHIEU, Jacques *et al.* Going viral: emerging opportunities for phage-based bacterial control in water treatment and reuse. **Accounts of chemical research**, v. 52, n. 4, p. 849-857, 2019.

MAURICE, C. F. *et al.* Linking the lytic and lysogenic bacteriophage cycles to environmental conditions, host physiology and their variability in coastal lagoons. **Environmental microbiology**, v. 15, n. 9, p. 2463-2475, 2013.

MCCALLIN, Shawna *et al.* Safety analysis of a Russian phage cocktail: from metagenomic analysis to oral application in healthy human subjects. **Virology**, v. 443, n. 2, p. 187-196, 2013.

MENDES, João J. *et al.* Wound healing potential of topical bacteriophage therapy on diabetic cutaneous wounds. **Wound Repair and Regeneration**, v. 21, n. 4, p. 595-603, 2013.

MERINO, Lina *et al.* Biofilm formation by *Salmonella* sp. in the poultry industry: Detection, control and eradication strategies. **Food Research International**, v. 119, p. 530-540, 2019.

MILLER, Eric S. *et al.* Bacteriophage T4 genome. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 67, n. 1, p. 86-156, 2003.

MIRANDA-TELLO, Elizabeth *et al.* *Petrotoga mexicana* sp. nov., a novel thermophilic, anaerobic and xylanolytic bacterium isolated from an oil-producing well in the Gulf of Mexico. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 169-174, 2004.

MIRZAEI, Mohammadali Khan *et al.* Genomic, proteomic, morphological, and phylogenetic analyses of vB_EcoP_SU10, a podoviridae phage with C3 morphology. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. e116294, 2014.

MOCÉ-LLIVINA, Laura *et al.* Survival of bacterial indicator species and bacteriophages after thermal treatment of sludge and sewage. **Applied and Environmental microbiology**, v. 69, n. 3, p. 1452-1456, 2003.

MOLIN, Søren; TOLKER-NIELSEN, Tim. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. **Current opinion in biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 255-261, 2003.

MØLLER-OLSEN, Christian *et al.* Engineered K1F bacteriophages kill intracellular Escherichia coli K1 in human epithelial cells. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-18, 2018.

MOORMEIER, Derek E.; BAYLES, Kenneth W. Staphylococcus aureus biofilm: a complex developmental organism. **Molecular microbiology**, v. 104, n. 3, p. 365-376, 2017.

MORONA, Renato; KRÄMER, C.; HENNING, U. L. F. Bacteriophage receptor area of outer membrane protein OmpA of Escherichia coli K-12. **Journal of bacteriology**, v. 164, n. 2, p. 539-543, 1985.

MOTLAGH, Amir Mohaghegh; BHATTACHARJEE, Ananda Shankar; GOEL, Ramesh. Biofilm control with natural and genetically-modified phages. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 4, p. 67, 2016.

NOBREGA, Franklin L. *et al.* Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 12, p. 760-773, 2018.

NELSON, Daniel. Phage taxonomy: we agree to disagree. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 21, p. 7029-7031, 2004.

NGUYEN, Dao *et al.* Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. **Science**, v. 334, n. 6058, p. 982-986, 2011.

ODA, Masahito *et al.* Rapid detection of Escherichia coli O157: H7 by using green fluorescent protein-labeled PP01 bacteriophage. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 1, p. 527-534, 2004.

OECHSLIN, Frank *et al.* Synergistic interaction between phage therapy and antibiotics clears Pseudomonas aeruginosa infection in endocarditis and reduces virulence. **The Journal of infectious diseases**, v. 215, n. 5, p. 703-712, 2017.

OKUDA, Ken-ichi *et al.* Effects of bacteriocins on methicillin-resistant Staphylococcus aureus biofilm. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 11, p. 5572-5579, 2013.

OLSZAK, Tomasz *et al.* In vitro and in vivo antibacterial activity of environmental bacteriophages against Pseudomonas aeruginosa strains from cystic fibrosis patients. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 14, p. 6021-6033, 2015.

PARRA, Bárbara; ROBESON, James. Selection of polyvalent bacteriophages infecting Salmonella enterica serovar Choleraesuis. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 72-76, 2016.

PAUL, John H. Microbial gene transfer: an ecological perspective. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 45-50, 1999.

PHOTHAWORN, Preeda *et al.* Development of a broad-spectrum Salmonella phage cocktail containing Viunalike and Jerseylike viruses isolated from Thailand. **Food microbiology**, v. 92, p. 103586, 2020.

PIRES, Diana P. *et al.* Genetically engineered phages: a review of advances over the last decade. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 3, p. 523-543, 2016.

PIRES, Diana P. *et al.* Phage therapy as an alternative or complementary strategy to prevent and control biofilm-related infections. **Current opinion in microbiology**, v. 39, p. 48-56, 2017.

PIRES, Diana P. *et al.* Current challenges and future opportunities of phage therapy. **FEMS microbiology reviews**, v. 44, n. 6, p. 684-700, 2020.

PRINCIPI, Nicola; SILVESTRI, Ettore; ESPOSITO, Susanna. Advantages and limitations of bacteriophages for the treatment of bacterial infections. **Frontiers in pharmacology**, v. 10, p. 513, 2019.

PUNIL, Renzo *et al.* Isolation and Characterization of Φ GF1, a Morphotype C3 Bacteriophage that Infects Escherichia coli. **bioRxiv**, p. 627976, 2019.

RAO, Venigalla B.; BLACK, Lindsay W. Structure and assembly of bacteriophage T4 head. **Virology journal**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2010.

REN, Hongyu *et al.* Genome sequence analysis of Vibrio parahaemolyticus lytic phage Vp_R1 with a C3 morphotype. **Archives of virology**, v. 164, n. 11, p. 2865-2871, 2019.

RIEDE, Isolde; ESCHBACH, Marie-Luise. Evidence that TraT interacts with OmpA of Escherichia coli. **FEBS letters**, v. 205, n. 2, p. 241-245, 1986.

ROACH, Dwayne R.; DONOVAN, David M. Antimicrobial bacteriophage-derived proteins and therapeutic applications. **Bacteriophage**, v. 5, n. 3, p. e1062590, 2015.

RODRÍGUEZ-RUBIO, Lorena *et al.* Bacteriophage virion-associated peptidoglycan hydrolases: potential new enzybiotics. **Critical reviews in microbiology**, v. 39, n. 4, p. 427-434, 2013.

RODRÍGUEZ-RUBIO, Lorena *et al.* Phage lytic proteins: biotechnological applications beyond clinical antimicrobials. **Critical reviews in biotechnology**, v. 36, n. 3, p. 542-552, 2016.

RÖLING, Wilfred FM; HEAD, Ian M.; LARTER, Steve R. The microbiology of hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs: perspectives and prospects. **Research in Microbiology**, v. 154, n. 5, p. 321-328, 2003.

SALMOND, George PC; FINERAN, Peter C. A century of the phage: past, present and future. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 12, p. 777-786, 2015.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular Cloning - Sambrook & Russel - Vol. 1, 2, 3. **Cold Springs Harb. Lab. Press** 3th Edition, 2001.

SAYERS, J. R. Bacteriophage T5. **The bacteriophages. Oxford University Press, New York, NY**, p. 268-276, 2006.

SEYEDIRASHTI, S.; WOOD, C.; AKAGI, J. M. Induction and partial purification of bacteriophages from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough) and *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 13541. **Microbiology**, v. 137, n. 7, p. 1545-1549, 1991.

SEYEDIRASHTI, S.; WOOD, Charles; AKAGI, J. M. Molecular characterization of two bacteriophages isolated from *Desulfovibrio vulgaris* NCIMB 8303 (Hildenborough). **Microbiology**, v. 138, n. 7, p. 1393-1397, 1992.

SHAN, Jinyu *et al.* Bacteriophages are more virulent to bacteria with human cells than they are in bacterial culture; insights from HT-29 cells. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2018.

SILLANKORVA, Sanna; NEUBAUER, Peter; AZEREDO, Joana. Phage control of dual species biofilms of *Pseudomonas fluorescens* and *Staphylococcus lentus*. **Biofouling**, v. 26, n. 5, p. 567-575, 2010.

SINGLA, Saloni *et al.* Bacteriophage-loaded nanostructured lipid carrier: improved pharmacokinetics mediates effective resolution of *Klebsiella pneumoniae*-induced lobar pneumonia. **The Journal of infectious diseases**, v. 212, n. 2, p. 325-334, 2015.

STOODLEY, Paul *et al.* Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 187-209, 2002.

STEWART, Philip S.; COSTERTON, J. William. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **The lancet**, v. 358, n. 9276, p. 135-138, 2001.

STUMMEYER, Katharina *et al.* Evolution of bacteriophages infecting encapsulated bacteria: lessons from *Escherichia coli* K1-specific phages. **Molecular microbiology**, v. 60, n. 5, p. 1123-1135, 2006.

RAKHUBA, D. V. *et al.* Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. **Polish journal of microbiology**, v. 59, n. 3, p. 145, 2010.

SUMMER, Elizabeth J. *et al.* Phage of sulfate reducing bacteria isolated from high saline environment. In: **CORROSION 2011**. OnePetro, 2011.

SUTTLE, Curtis A. Marine viruses—major players in the global ecosystem. **Nature reviews microbiology**, v. 5, n. 10, p. 801-812, 2007.

TANG, Kimberley; BASKARAN, Vikrama; NEMATI, Mehdi. Bacteria of the sulphur cycle: an overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 73-94, 2009.

THAUER, Rudolf K.; STACKEBRANDT, Erko; HAMILTON, W. Alan. Energy metabolism and phylogenetic diversity of sulphate-reducing bacteria. **Sulphate-reducing bacteria**, p. 1-38, 2007.

TORRES-BARCELÓ, Clara; HOCHBERG, Michael E. Evolutionary rationale for phages as complements of antibiotics. **Trends in microbiology**, v. 24, n. 4, p. 249-256, 2016.

TRAURIG, Michael; MISRA, Rajeev. Identification of bacteriophage K20 binding regions of OmpF and lipopolysaccharide in Escherichia coli K-12. **FEMS microbiology letters**, v. 181, n. 1, p. 101-108, 1999.

TROJET, Sabrina N. *et al.* The gp38 adhesins of the T4 superfamily: a complex modular determinant of the phage's host specificity. **Genome biology and evolution**, v. 3, p. 674-686, 2011.

TURNER, Dann; KROPINSKI, Andrew M.; ADRIAENSSENS, Evelien M. A roadmap for genome-based phage taxonomy. **Viruses**, v. 13, n. 3, p. 506, 2021.

TWORT, Frederick W. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. **The Lancet**, v. 186, n. 4814, p. 1241-1243, 1915.

VAHEDI, Azadeh *et al.* Isolation and identification of specific bacteriophage against enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) and in vitro and in vivo characterization of bacteriophage. **FEMS microbiology letters**, v. 365, n. 16, p. fny136, 2018.

VAN TWEST, Rohan; KROPINSKI, Andrew M. Bacteriophage enrichment from water and soil. In: **Bacteriophages**. Humana Press, 2009. p. 15-21.

VÁZQUEZ, Roberto *et al.* Csl2, a novel chimeric bacteriophage lysin to fight infections caused by Streptococcus suis, an emerging zoonotic pathogen. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2017.

WALIA, Kamini *et al.* Understanding policy dilemmas around antibiotic use in food animals & offering potential solutions. **The Indian journal of medical research**, v. 149, n. 2, p. 107, 2019.

WALKER, Christopher B. *et al.* Recovery of temperate Desulfovibrio vulgaris bacteriophage using a novel host strain. **Environmental microbiology**, v. 8, n. 11, p. 1950-1959, 2006.

WITZANY, Guenther. What Does Communication of Phages Mean?. In: **Biocommunication of Phages**. Springer, Cham, 2020. p. 1-22.

WIDDEL, H. U. Correlations between atomic oxygen airglow and radio wave absorption in winter. **Journal of Atmospheric and Terrestrial Physics**, v. 42, n. 4, p. 331-337, 1980.

WHO. Antibiotic resistance. 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>>. Acesso em: 06 de jun. 2021.

YIN, Supeng *et al.* Phage Abp1 rescues human cells and mice from infection by pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 6, p. 2337-2345, 2017.

XU, Dan *et al.* Characterization of a biofilm-forming *Shigella flexneri* phenotype due to deficiency in Hep biosynthesis. **PeerJ**, v. 4, p. e2178, 2016.

XU, Dan *et al.* Advances in the treatment of problematic industrial biofilms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 5, p. 97, 2017.

ŻACZEK, M.; WEBER-DĄBROWSKA, B.; GÓRSKI, A. Phages in the global fruit and vegetable industry. **Journal of applied microbiology**, v. 118, n. 3, p. 537-556, 2015.

ZARASVAND, Kiana Alasvand; RAI, V. Ravishankar. Microorganisms: induction and inhibition of corrosion in metals. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 87, p. 66-74, 2014.

ZUMSTEG, Anna Brotcke *et al.* IcsA is a *Shigella flexneri* adhesin regulated by the type III secretion system and required for pathogenesis. **Cell host & microbe**, v. 15, n. 4, p. 435-445, 2014.