

JÉSSICA DUARTE DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DO BACTERIÓFAGO
LÍTICO vB_EcoM_UFV09**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S586c
2019
Silva, Jéssica Duarte da, 1994-
Caracterização e otimização da produção do bacteriófago
lítico vB_EcoM_UFV09 / Jéssica Duarte da Silva. – Viçosa,
MG, 2019.
vi, 53 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Sérgio Oliveira de Paula.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Bacteriófagos. 2. Otimização matemática. 3. Bactérias
redutoras de sulfato. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia Agrícola. II. Título.

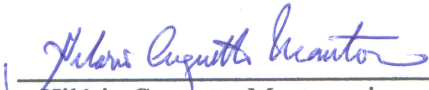
CDD 22. ed. 579.26

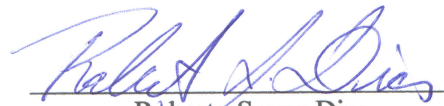
JÉSSICA DUARTE DA SILVA

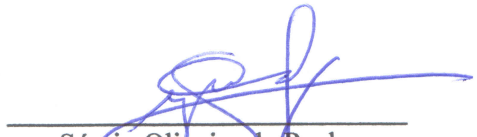
**CARACTERIZAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DO BACTERÍO FAGO
LÍTICO vB_EcoM_UFV09**

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

APROVADA: 26 de fevereiro de 2019.


Hilário Cuquetto Mantovani


Roberto Sousa Dias


Sérgio Oliveira de Paula
(Orientador)

Dedico esse trabalho ao sistema público de educação do Brasil, e às pessoas que lutam por ele. Do maternal ao ensino superior, sempre tive o privilégio de poder contar com os auxílios e a estrutura da rede pública, que em um momento de desmonte, merece ser exaltada.

Dedico-o ainda à minha família e amigos, à todas as pessoas que acreditaram em mim, e acima de tudo à Deus, que sempre me guiou por essa jornada.

RESUMO

SILVA, Jéssica Duarte, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Caracterização e otimização da produção do bacteriófago lítico vB_EcoM_UFV09.** Orientador: Sérgio Oliveira de Paula.

Bacteriófagos, ou fagos, são vírus que infectam bactérias. Logo após serem descritos, esses organismos já eram usados no tratamento contra bactérias patogênicas, o que chamamos de fagoterapia. Porém, com a descoberta da penicilina no final dos anos 30, a utilização dos bacteriófagos na clínica médica foi perdendo a força até ser praticamente esquecido. O recente aumento de cepas bacterianas resistentes à antibióticos fez com que a fagoterapia voltasse a surgir como alternativa no tratamento de doenças bacterianas. Outra importante aplicação dos bacteriófagos é contra os biofilmes bacterianos. Dentre as enzimas fágicas com importante potencial contra os biofilmes estão as hidrolases do tipo depolimerases, e as lisinas. Sendo assim, o estudo envolvendo bacteriófagos ultrapassa a aplicação médica e começa a ser considerado para contextos mais amplos, em escala ambiental. Uma das principais limitações do uso de bacteriófagos em sistemas ambientais é a quantidade exponencialmente maior de partículas virais do que se é produzido normalmente em laboratório. Estudos e metodologias que visam otimizar e tornar economicamente viável a produção de bacteriófagos em larga escala são de extrema importância e representam uma demanda crescente. Este trabalho teve como objetivo caracterizar de forma morfológica e genômica o fago vB_EcoM_UFV09, que foi isolado a partir de amostras de esgoto, utilizando-se uma estirpe de bactéria *Escherichia coli* como hospedeira e analisar seu potencial na fagoterapia. Além disso, foi avaliado o impacto dos parâmetros de cultivo: temperatura, tempo de incubação, agitação e Multiplicity of Infection (MOI), na produção viral, comparando-se os resultados obtidos em meio mínimo M9 suplementado com seis fontes de carbono diferentes (acetato, ácido láctico, piruvato, glicerol, succinato e glicose) e em meio rico Luria Bertani (LB). Nossos resultados demonstraram que o isolado pertence à família *Myoviridae*, mais especificamente ao gênero T4. A ausência de genes de patogenicidade e de resistência à antibióticos no genoma do vB_EcoM_UFV09, assim como a lise obrigatória da célula bacteriana após a infecção viral, são características promissoras para a utilização desse fago no controle do crescimento de estirpes da bactéria *Escherichia coli*. Além disso, a avaliação do impacto das variáveis de cultivo na produção da progênie viral demonstrou que fontes de carbono como succinato, glicose e LB proporcionam condições fisiológicas mais estáveis para a produção fago vB_EcoM_UFV09 em larga escala.

ABSTRACT

SILVA, Jéssica Duarte M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **Characterization and production optimization of vB_EcoM_UFV09 lithic bacteriophage.** Adviser: Sérgio Oliveira de Paula

Bacteriophages, or phages, are viruses that infect bacteria. Soon after being described, these organisms were already used in the treatment against pathogenic bacteria, what we call phage therapy. However, with the discovery of penicillin in the late 1930s, the use of bacteriophage in medical clinic was losing its strength until it was virtually forgotten. It was the recent increase in bacterial strains resistant to antibiotics that made phage therapy reborn like an alternative in the treatment of bacterial diseases. Another important application of bacteriophages is against bacterial biofilms. Among the phage enzymes with significant biotechnological potential against biofilms are hydrolases of the type depolymerases, that acts directly on EPS degradation, and lysines, which act on the peptidoglycane. Thus, the study involving bacteriophages surpasses the medical application and begins to be considered for broader contexts, on an environmental scale. However, the major limitations bacteriophages use in environmental systems are the exponentially greater number of viral particles than is normally produced in laboratories. Thus, studies and methodologies aimed at optimizing and making economically viable the production of bacteriophages on a large scale are extremely important and represent a growing demand. The objective of this work was to characterize the phage vB_EcoM_UFV09, which was isolated from sewage samples, using a strain of bacteria *Escherichia coli* as host and to analyze its potential in phage therapy. In addition, the impact of culture parameters: temperature, incubation time, agitation and Multiplicity of Infection (MOI) on viral production were evaluated, comparing the results obtained in M9 minimal medium supplemented with six different carbon sources (acetate, lactic acid, pyruvate, glycerol, succinate and glucose) and rich media Luria Bertani (LB). Our results demonstrated that the isolate belongs to the Myoviridae family, more specifically to the T4 genus. The absence of pathogenicity and antibiotic resistance genes in the vB_EcoM_UFV09 genome, as well as compulsory lysis of the bacterial cell after viral infection, are promising features for the use of such phage in controlling the growth of *Escherichia coli* strains. In addition, the evaluation of the impact of culture variables on the production of viral progeny has shown that carbon sources such as succinate, glucose and LB provide more stable physiological conditions for vB_EcoM_UFV09 phage production on a large scale.

SUMÁRIO

Introdução Geral	1
1- Capítulo 1 – Caracterização genômica e morfológica do fago lítico, T4-like, vB_EcoM_UFV09.....	8
1.1- Resumo	8
1.2- Introdução	9
1.3- Metodologia	11
1.3.1- Isolamento e purificação vB_EcoM_UFV09.....	11
1.3.2- Caracterização morfológica do bacteriófago	11
1.3.3- Curva de One-Step Growth.....	11
1.3.4- Determinação do espectro de hospedeiros	12
1.3.5- Extração do genoma viral	13
1.3.6- Identificação e caracterização do bacteriófago vB_EcoM_UFV09.....	13
1.3.7- Análises de bioinformática.....	14
1.4- Resultados	15
1.4.1- Características Biológicas do bacteriófago vB_EcoM_UFV09.....	15
1.4.2- Análise genômica do bacteriófago vB_EcoM_UFV09	15
1.5- Discussão	20
1.6- Conclusão.....	22
1.7- Referências.....	23
Capítulo 2 – Otimização da produção do bacteriófago EcoM-UFV9 em diferentes fontes de Carbono.....	26
2.1- Resumo	26
2.2- Introdução	27
2.3- Metodologia.....	30
2.3.1- Linhagem bacteriana e Bacteriófago vB_EcoM-UFV9.....	30
2.3.2- Meio mínimo M9 e Luria Bertani Broth (LB)	31
2.3.4- Avaliação da cinética de crescimento bacteriano.....	32
2.3.5- Delineamento de Composto Central Rotacional com 4 variáveis.....	32
2.3.6- Montagem dos experimentos de DCCR.....	32
2.3.7- Quantificação do título viral	33
2.3.8- Avaliação dos impactos dos parâmetros operacionais de cultivo na produção de partículas virais.....	33
2.4- Resultados.....	34
2.4.1- Avaliação da cinética de crescimento bacteriano.....	34
2.4.2- Avaliação dos impactos dos parâmetros operacionais de cultivo na produção da progênie viral do bacteriófago vB_EcoM_UFV09	35
2.4.3- Predição da produção de partículas virais nos diferentes meios de cultivo.....	41

2.5- Discussão	43
2.6- Conclusão	49
2.7- Referências	50
2.8.1- Anexo 1 – Delineamento experimental	52
2.8.2- Anexo 2 – Meios e Tampões utilizados.....	53

Introdução Geral

Bacteriófagos, também chamados de fagos, são vírus que infectam bactérias. Descritos de forma independente por Frederick Twort em 1915 e Felix d’Herelle em 1917, são considerados os organismos mais abundantes do planeta, numa estimativa de aproximadamente 10^{31} partículas presentes na biosfera (COMEAU *et al.*, 2008; KEEN, 2012).

D’Herelle rapidamente identificou o potencial que sua descoberta carregava. O raciocínio era simples: as doenças bacterianas assolavam a humanidade sem que metodologias de controle fossem realmente efetivas, ele tinha em mãos o que acreditava ser um vírus que lisava células bacterianas. Por que não tentar utilizar esses vírus para controlar o crescimento de bactérias patogênicas? Esse pensamento foi a base do que chamamos atualmente de fagoterapia (ENDERSEN, *et al.*, 2014; KEEN, 2012; KEEN; GABLES, 2016).

Em 1919, d’Herelle já havia isolado fagos específicos para diversas bactérias patogênicas, tais como *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria meningitis* e diferentes espécies do gênero *Streptococcus* (FRUCIANO; BOURNE, 2007).

Porém, embora os resultados fossem promissores, a eficácia do tratamento era inconsistente. Atualmente, associa-se a inconstância dos resultados ao conhecimento restrito que os pesquisadores detinham sobre etapas críticas no processo de infecção viral, tais como a especificidade vírus-hospedeiro, ciclos de lise/lisogenia, e cinética de infecção (GÓRSKI *et al.*, 2012, ENDERSEN *et al.*, 2014; KEEN, 2012).

Após os resultados contraditórios obtidos por d’Herelle e a descoberta da penicilina em 1928 por Alexander Fleming, a fagoterapia perdeu espaço como uma alternativa viável no controle do crescimento bacteriano, sendo deixada de lado na maioria dos países, com exceção de Polônia e Rússia (ENDERSEN *et al.*, 2014; KEEN, 2012).

A fagoterapia poderia ter continuado adormecida, não fosse uma necessidade crescente no meio científico: o combate à bactérias multi-droga resistentes (O’NEILL, 2016). A resistência microbiana à antibióticos se tornou uma crise. Desde a descoberta da penicilina, estima-se que mais de 1 milhão de toneladas de antibióticos tenham sido usados ao redor do mundo (ANDERSSON; HUGHES, 2010, VENTOLA, 2015). Além do uso em pacientes humanos, uma grande quantidade de antibióticos é usada no tratamento de animais (VAN BOECKEL *et al.*, 2015).

Dados de 2016 indicam que, por ano, 700 mil pessoas morrem por causa de bactérias resistentes. Esse número pode chegar a 10 milhões de mortes/ano em 2050. (O'NEILL, 2016). Um grande esforço mundial vem sendo empregado para controlar o aumento da resistência microbiana à antibióticos. A maioria deles visa a diminuição do uso indiscriminado de tais compostos, procuram otimizar os protocolos de tratamento, otimizando as concentrações, dosagem e período de tratamento. O diagnóstico incerto de doenças e principalmente dos agentes causadores das enfermidades também contribuem muito para o desperdício de antibióticos e da proliferação de células resistentes (VENTOLA, 2015).

Dessa forma, a utilização de bacteriófagos voltou a se tornar uma importante ferramenta de controle do crescimento microbiano, e sua potencial utilização em bactérias resistentes vêm chamando a atenção. A alta especificidade fago-hospedeiro, que previne infecções secundárias, e a ação específica em células bacterianas, não afetando, portando, células eucarióticas, são características que tornam essa aplicação tão relevante (GOLKAR; BAGASRA; PACE, 2014).

Enquanto a aplicação de bacteriófagos para tratamento em humanos está voltando a ser experimentada, mesmo que ainda de forma ainda modesta (WRIGHT *et al.*, 2009), a utilização deles no controle de doenças veterinárias e em problemas ambientais associados à ação de micro-organismos, tem sido feita de forma recorrente (BELGINI *et al.*, 2014; DUARTE *et al.*, 2018; DUARTE *et al.*, 2016).

Outra importante aplicação dos bacteriófagos é contra os biofilmes bacterianos. O biofilme é um arranjo células biologicamente ativas e de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que se associam com uma superfície (COSTERTON *et al.* 1987). Esse arranjo celular é problemático especialmente em ambientes industriais e hospitalares, pois podem impedir o fluxo de calor através de superfícies, e aumentar a corrosão de determinados materiais, além de tornar as células sob a matriz exopolissacarídica muito mais resistentes à ação de biocidas (KUMAR, ANAND, 1998)

Dentre as enzimas fágicas com importante potencial biotecnológico contra os biofilmes estão as depolimerases, com ação direta na degradação do EPS, e as lisinas, que podem ser classificadas com lisozimas (pois hidrolisam as ligações glicosídicas β 1,4 entre resíduos do ácido N-acetilmurâmico e N-Acetil-D-glucosamina do peptídeo glicano) ou amidases (que clivam as ligações glicano-peptídicas da parede celular, entre o ácido N-acetilmurâmico e região L-alanina da cauda peptídica que se liga à esse açúcar na parede

celular) (CHAN, ABEDON, 2015, FISCHETTI, 2005). A capacidade dos fagos em desarranjar um biofilme bacteriano por si só já é consideravelmente importante, uma vez que pode ser utilizada em ambientes onde os biofilmes causam prejuízos. Além disso, por causa ação inespecífica dessas hidrolases, é possível isolar um fago a partir de um hospedeiro de fácil cultivo e utilizá-lo para combater o biofilme de outro grupo bacteriano, de crescimento e cultivo complexo (CHAN, ABEDON, 2015; MACIEJEWSKA, OLSZAK, DRULIS-KAWA, 2018).

Esse trabalho traz como perspectiva da utilização de fagos num aspecto ambiental, utilizando a indústria petrolífera como exemplo, onde um grupo de micro-organismos em especial causa problemas de corrosão e produção de gases tóxicos. Os Procariotos Redutores de Sulfato (PRS) possuem representantes tanto do domínio Archaea quanto Bacteria, capazes de utilizar o sulfato como acceptor final de elétrons durante a respiração, e que tem como principal produto desse metabolismo, o sulfeto de hidrogênio (H₂S) (CASTRO *et al*, 2000; BARTON, HAMILTON, 2007; RABUS *et al*, 2015).

Eles estão presentes na água do mar, que pode ser injetada nos poços quando a pressão natural deles se extingue, num processo denominado recuperação secundária do petróleo. A água proveniente desse processo é chamada “água de produção” e precisa ser armazenada nas plataformas petrolíferas até ser tratada. O armazenamento da água de produção nos tanques cria um ambiente que se torna rapidamente anóxico e rico em compostos sulfurados, muito propício para o crescimento de PRS (CURBELO, 2006; GIEG, 2011; GRABOWSKI *et al*, 2005).

Esses organismos formam biofilmes nos tanques e nos tubos das plataformas, sendo os principais responsáveis pelo processo de corrosão biogênica em ambientes relacionados ao petróleo. A presença deles também acentua a acidificação do meio e aumenta a concentração de compostos sulfurados no petróleo, um fenômeno denominado “*souring*”, que resulta na diminuição do seu valor de mercado (CURBELO, 2006; GIEG, 2011; GRABOWSKI *et al*, 2005).

Atualmente, o uso de biocidas é uma opção na tentativa de controlar o crescimento de PRS. Porém, o desenvolvimento da resistência microbiana a esses compostos e a problemática relacionada ao descarte desses biocidas no ambiente (que permanecem no efluente mesmo após as etapas de tratamento), além dos elevados custos operacionais fazem com que

alternativas eficientes contra os PRS se tornem de grande interesse para as empresas. (FRAISE, 2002; STEWART, COSTERTON, 2001).

Por conta disso, a utilização de bacteriófagos pode ser uma interessante alternativa para o controle do crescimento de PRS. Embora o grupo conte com mais de 30 gêneros, e o isolamento de bacteriófagos líticos para cada um deles se torne um problema, a utilização de bacteriófagos que produzam enzimas capazes de impedir ou desestruturar o biofilme bacteriano se mostrou um tratamento promissor em estudos recentes do nosso grupo de pesquisa (CHAN, ABEDON, 2015; RABUS *et al* 2015; DUARTE *et al*, 2018; BELGINI , 2014).

Uma das principais limitações do uso de bacteriófagos em sistemas ambientais é a necessidade de uma quantidade de partículas virais exponencialmente maior do que se é produzido normalmente em laboratório. Dessa forma, estudos e metodologias que visem otimizar e tornar economicamente viável a produção de bacteriófagos em larga escala são de extrema importância e representam uma demanda crescente.

A obtenção de novas partículas virais envolve tanto o cultivo do hospedeiro quanto do vírus. No caso dos bacteriófagos, é necessário o cultivo das células bacterianas antes do processo de propagação em si. O meio Luria Bertani (LB) é um meio rico e complexo, muito utilizado para o cultivo de enterobactérias, como é o caso da *Escherichia coli*. Esse meio já possui diversos precursores que são utilizados pela célula, que por conta disso, consegue crescer de forma excepcionalmente rápida com o tempo de geração de 20 minutos na fase exponencial de crescimento (MILLER *et al*, 2003; SEZONOV; ARI, 2007). Apesar das vantagens de cultivo, se uma propagação viral em larga escala fosse realizada em meio LB, os custos operacionais seriam altíssimos. Uma alternativa para esse problema, seria a utilização de outro meio de cultivo para o crescimento das células bacterianas. O meio mínimo M9 é composto basicamente por sais e íons, tais como fosfato de sódio dibásico, fosfato monopotássico, cloreto de sódio, cloreto de amônio, cloreto de cálcio e sulfato de magnésio, além de uma fonte de carbono. Essa alternativa só é possível devido à grande capacidade metabólica da bactéria *E. coli*, que é capaz de sintetizar todos seus precursores celulares mesmo crescendo em um meio oligotrófico como é o caso do meio M9, apesar de não apresentar a mesma velocidade de crescimento de quando é cultivada em um meio rico (LI *et al.*, 2014).

Cerca de 96% dos fagos descritos são caudados e pertencem à ordem *Caudovirales*. Essa ordem se divide em quatro importantes famílias: Siphoviridae, Myoviridae, Podoviridae e, recentemente, Ackermannviridae. (CHRISTIE, DOKLAND 2012). Dentre os *Myoviridae*, o fago T4 é um dos mais estudados. Com genoma de 168,8 kb, e sem os genes de lisogenia, o bacteriófago T4 possui, notoriamente, um grande potencial na fagoterapia (MILLER et al, 2003).

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar de forma genômica e morfológica um novo fago T4-like, denominado vB_EcoM_UFV09, que em estudos anteriores, se apresentou eficaz na diminuição do biofilme bacteriano formado em um sistema de fluxo contínuo (looping), avaliando seu potencial como agente fagoterápico. Além disso descrevemos as melhores condições do cultivo dele para a produção em larga escala, utilizando-se da estratégia de Delineamento de Composto Central Rotacional (DCCR) para medir influência de 4 variáveis de produção: Temperatura (Te), Tempo de incubação (Ti) Agitação (Ag) e *Multiplicity of Infection* (MOI), em sete diferentes meios de cultivo.

Referências

ANDERSSON, Dan I.; HUGHES, Diarmaid. Antibiotic resistance and its cost: Is it possible to reverse resistance? **Nature Reviews Microbiology** v. 8, n. 4, p. 260–271 , 2010.

BARTON, Larry L.; HAMILTON, W. Allan (Ed.). Sulphate-reducing bacteria: environmental and engineered systems. **Cambridge University Press**, 2007.

BELGINI, D. R. B. et al. Culturable bacterial diversity from a feed water of a reverse osmosis system, evaluation of biofilm formation and biocontrol using phages. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 10, p. 2689-2700, 2014

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

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

CHRISTIE, Gail E; DOKLAND, Terje. Pirates of the Caudovirales. **Virology** v. 434, n. 2, p. 210–221 , 2012.

COMEAU, André M. *et al.* Exploring the prokaryotic virosphere. **Research in Microbiology** v. 159, n. 5, p. 306–313 , 2008.

COSTERTON, J. William *et al.* Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 435-464, 1987.

CURBELO, Fabíola D. S. Recuperação avançada de petróleo utilizando tensoativos. **Doutorado, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte**, Natal-RN, 2006.

DUARTE, Silva *et al.* A T4virus prevents bio fi lm formation by Trueperella pyogenes. **Veterinary Microbiology** v. 218, n. October 2017, p. 45–51 , 2018.

DUARTE, Vinícius S *et al.* Complete Genome Sequence of vB _ EcoM-UFV13 , a New Bacteriophage Able To Disrupt Trueperella pyogenes Biofilm. v. 4, n. 6, p. 4–5 , 2016.

ENDERSEN, L. O'MAHONY, J. HILL, C. ROSS, RP. MCAULIFFE, O. COFFEY, A. Phage therapy in the food industry. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences** v. 6, n. 1, p. 265–269 , 2014 .

FRAISE, A. P. Biocide abuse and antimicrobial resistance—a cause for concern?. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 11-12, 2002.

FISCHETTI, Vincent A. Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives. **Trends in microbiology**, v. 13, n. 10, p. 491-496, 2005

FRUCIANO, 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.

GRABOWSKI, Agnès et al. Microbial diversity in production waters of a low-temperature biodegraded oil reservoir. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 54, n. 3, p. 427-443, 2005.

GIEG, Lisa M.; JACK, Tom R.; FOGHT, Julia M. Biological souring and mitigation in oil reservoirs. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 92, n. 2, p. 263, 2011.

GOLKAR, Zhabiz; BAGASRA, Omar; PACE, Donald. Bacteriophage therapy: A potential solution for the antibiotic resistance crisis. **Journal of Infection in Developing Countries** v. 8, n. 2, p. 129–136 , 2014.

GÓRSKI, Andrzej et al. Phage as a modulator of immune responses: practical implications for phage therapy. In: Advances in virus research. **Academic Press**, 2012. p. 41-71.

KEEN, Eric C. Phage therapy : concept to cure. **Frontiers in Microbiology** v. 3, n. July, p. 1–3 , 2012.

KEEN, Eric C; GABLES, Coral. A century of phage research: Bacteriophages and the shaping of modern biology. **HHS Public Access Bioessays** v. 37, n. 1, p. 6–9 , 2016.

KUMAR, C. Ganesh; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International journal of food microbiology**, v. 42, n. 1-2, p. 9-27, 1998.

LI, Zhaopeng; NIMTZ, Manfred; RINAS, Ursula. The metabolic potential of Escherichia coli BL21 in defined and rich medium. **Microbial cell factories**, v. 13, n. 1, p. 45, 2014.

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.

MILLER, Eric S. et al. Bacteriophage T4 genome. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 67, n. 1, p. 86-156, 2003.

O'NEILL, Jim. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. n. May , 2016.

RABUS, Ralf et al. A post-genomic view of the ecophysiology, catabolism and biotechnological relevance of sulphate-reducing prokaryotes. In: **Advances in microbial physiology**. Academic Press, 2015. p. 55-321.

SEZONOV, Guennadi; JOSELEAU-PETIT, Danièle; D'ARI, Richard. Escherichia coli physiology in Luria-Bertani broth. **Journal of bacteriology**, v. 189, n. 23, p. 8746-8749, 2007.

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

VAN BOECKEL, Thomas P. *et al.* Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 112, n. 18, p. 5649–5654 , 2015.

VENTOLA, C. Lee. The Antibiotic Resistance Crisis. **P&T** v. 40, n. 4, p. 278–283 , 2015

WRIGHT, A *et al.* A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. **Clinical Otolaryngology** p. 349–357 , 2009.

1- Capítulo 1 – Caracterização genômica e morfológica do fago lítico, T4-like, vB_EcoM_UFV09

1.1- Resumo

Bacteriófagos, ou simplesmente fagos, são vírus que infectam bactérias, e podem ser usados para controlar o crescimento de uma espécie bacteriana, a partir da lise celular proveniente do processo de infecção viral, num processo chamado fagoterapia. A bactéria *Escherichia coli* coloniza o intestino de animais endotérmicos e, em geral, não apresenta perigo ao ser humano. Entretanto, algumas estirpes, como a *E. coli* O157:H7 são consideradas enterohemorrágicas, e são um problema para a saúde pública, principalmente em países subdesenvolvidos. Essa espécie também é um importante modelo no estudo da colonização de superfícies e da formação de biofilmes bacterianos. Sendo assim, além da ação bactericida que os fagos líticos exercem sobre as células bacterianas, a ação de enzimas presentes na cauda de alguns desses fagos também vem despertando grande interesse biotecnológico, pois essas enzimas podem desarranjar o biofilme bacteriano composto tanto por bactérias hospedeiras quanto por bactérias que o fago não tem a capacidade de infectar. Esse trabalho teve como objetivo caracterizar de forma genômica e morfológica o fago de *E. coli* vB_EcoM_UFV09, além de buscar por enzimas de interesse biotecnológico e avaliar o seu uso na fagoterapia. Os resultados apontam que o vB_EcoM_UFV09 é um fago da família *Myoviridae*, mais especificamente do gênero *T4 virus*. Ele possui um genoma de 165,759 pb, que não contém genes de patogenicidade, de resistência à antibióticos ou recombinases. Além disso, ele é exclusivamente lítico, assim como os outros fagos T4-like. Essas características tornam o vB_EcoM_UFV09 um promissor agente fagoterápico para o controle de estirpes da bactéria *Escherichia coli*.

1.2- Introdução

O uso de bacteriófagos como metodologia no controle do crescimento microbiano começou logo após a descoberta desses organismos, por volta de 1915, e ganhou força nos anos 20 e 30 (CHAN *et al*, 2013; GOLKAR, BAGASRA, PACE, 2014). Casos de disenteria e diarreia curadas por coquetéis de fagos eram recorrentes, e a solução já era comercializada para países como Índia e Rússia (FRUCIANO; BOURNE, 2007). No entanto, a descoberta da penicilina associada à falta de conhecimento sobre a fisiologia e mecanismos de infecção virais fizeram com que a fagoterapia perdesse força (GOLKAR, 2014; KEEN, 2012). Embora os estudos envolvendo bacteriófagos tenham continuado, foi o aumento da resistência bacteriana aos antibióticos nos últimos anos que fez com que a fagoterapia voltasse a ser cogitada como uma interessante alternativa de tratamento (ENDERSEN, *et al* 2014; FRUCIANO *et al*, 2007; HYMAN; ABEDON, 2010).

Escherichia coli é uma bactéria gram-negativa, anaeróbia facultativa e tem como habitat o intestino de animais endotérmicos, representando até 1% da microbiota gastrointestinal (CALLAWAY *et al.*, 2007). Além da importância dessa espécie como organismo-modelo em diversos estudos no meio científico, algumas cepas, como a *E. coli* O157:H7 são enterohemorrágicas (BACH *et al.*, 2002). Essas cepas são capazes de começar uma infecção a partir de uma concentração inicial de poucas células (aproximadamente 10), e além de induzirem lesões no intestino, também produzem a toxina Shiga, responsável pela Síndrome hemolítica urêmica, o que torna a diarreia induzida por esses organismos ainda mais perigosa (BRÜSSOW, 2005; ENDERSEN, *et al*, 2014; PANOS, BETSI, FALAGAS, 2006).

Além de sua relevância patogênica, essa espécie também é um importante modelo no estudo da colonização de superfícies e da formação de biofilmes bacterianos, que podem ser definidos como uma matriz de células biologicamente ativas e de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que se associam com uma superfície (COSTERTON *et al.* 1987). Esse arranjo celular é problemático especialmente em ambientes industriais e hospitalares, pois podem impedir o fluxo de calor através de superfícies, e aumentar a corrosão de determinados materiais, além de tornar as células sob a matriz exopolissacarídica muito mais resistentes à ação de biocidas (KUMAR, ANAND, 1998)

Fagos capazes de infectar estirpes de *E. coli* vem sendo estudados a bastante tempo (DEMEREK; FANO, 1945; MILLER, 2003; RUSSELL, 1974). Dentre os mais conhecidos estão os T4-like, da família *Myoviridae* (BRÜSSOW, 2005).

Além da ação bactericida que os fagos líticos exercem sobre as células bacterianas, a ação de enzimas presentes na cauda de alguns desses fagos também vem despertando grande interesse biotecnológico, pois essas enzimas podem desarranjar o biofilme bacteriano composto tanto por bactérias hospedeiras quanto por bactérias que o fago não tem a capacidade de infectar (CHAN, ABEDON, 2015; MACIEJEWSKA, OLSZAK, DRULIS-KAWA, 2018). Dentre as enzimas fágicas com importante potencial biotecnológico contra os biofilmes estão as hidrolases do tipo depolimerases, com ação direta na degradação do EPS, e as lisinas, que agem no peptídeoglicano (CHAN, ABEDON, 2015, FISCHETTI, 2005). A capacidade dos fagos em desarranjar um biofilme bacteriano por si só já é consideravelmente importante, uma vez que pode ser utilizada em ambientes onde os biofilmes causam prejuízos. Além disso, por causa ação inespecífica dessas hidrolases, é possível isolar um fago a partir de um hospedeiro de fácil cultivo e utilizá-lo para combater o biofilme de outro grupo bacteriano, de crescimento e cultivo complexo (RODRÍGUEZ-RUBIO *et al*, 2013; CHAN, ABEDON, 2015; MACIEJEWSKA, OLSZAK, DRULIS-KAWA, 2018).

No presente estudo, caracterizamos de forma morfológica e genômica um novo fago T4-like, denominado vB_EcoM_UFV09, que apresentou ação inibitória no biofilme de *Escherichia coli* e de bactérias redutoras de sulfato, num sistema de fluxo fechado (looping). Dessa forma, avaliamos seu potencial como agente fagoterápico.

1.3- Metodologia

1.3.1- Isolamento e purificação vB_EcoM_UFV09

O bacteriófago vB_EcoM_UFV09 foi isolado a partir de uma amostra coletada no Rio São Bartolomeu, na altura do bairro Vale do Sol, na cidade de Viçosa, Minas Gerais, Brasil (coordenadas geográficas: latitude -20.743191; longitude -42.881961). A propagação foi feita utilizando a linhagem bacteriana *Escherichia coli* 30, cedida pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Gado de leite, e que agora faz parte do acervo de micro-organismos do Laboratório de Imunovirologia Molecular (LIVM), da Universidade Federal de Viçosa, *campus* Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

O protocolo utilizado foi adaptado de Wommack et al, 2009. Brevemente, a amostra de esgoto recolhida foi centrifugada a 8000 xg por 15 minutos. O sobrenadante foi recuperado e filtrado em filtros de 0,45 µm e, em seguida, 0,22 µm. Uma alíquota de 10 mL do sobrenadante filtrado foi adicionado ao mesmo volume de meio Luria Bertani (LB) contendo bactéria *E. coli* 30 no início da fase do crescimento, na Densidade Ótica (DO) de 0,3 - 0,4, no comprimento de onda de 600 nm (DO₆₀₀). Após 1 hora de incubação, foi realizado o plaqueamento por dupla camada, onde 1 mL da mistura foi transferido para um tubo de 1,5 mL e 100 µL de bactéria DO₆₀₀ 2,0 foram adicionados. Após o processo de plaqueamento, as placas de lise resultantes, ou placas que mostraram morfologia distintas, foram recortadas do ágar e propagadas de forma independente em meio LB.

1.3.2- Caracterização morfológica do bacteriófago

Para a visualização da partícula viral, foi realizada microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para tal, foram adicionados 10 µL de uma solução de tampão SM (Anexo 2) contendo o fago purificado e concentrado às grids cobertas com Formvar®. Após 5 minutos, o excesso de líquido foi removido com papel absorvente e a amostra foi contrastada com acetato de uranila 3%, durante 30 segundos. A amostra foi mantida em um dessecador até ser analisada. A visualização das partículas virais foi feita no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109, utilizando 250,000x de magnificação de HV de 80 kv.

1.3.3- Curva de One-Step Growth

A curva de One-Step Growth ilustra a cinética de infecção viral ao longo do tempo, e elucidada a progênie viral proveniente de cada rodada de infecção (Burst size). Para a determinação da curva de One-Step Growth e o cálculo de Burst Size, foi utilizado uma

adaptação do protocolo de Yang *et al.*, 2018. Resumidamente, 100 µL de fago, num MOI (Multiplicity of Infection) de 0,001 foi adicionado a 10 mL de bactéria ativada e em início de crescimento exponencial, com a DO₆₀₀ de 0,3. A mistura foi incubada por 10 minutos a 37 °C. Depois do tempo de adsorção, a mistura foi centrifugada por 2 minutos a 13000 xg. O sobrenadante foi descartado e, o pellet ressuspendido em 10 mL de meio LB. A amostra foi incubada à 37°C e alíquotas de 100 µL foram coletadas a cada 10 minutos, num período de 3 horas. A quantificação de partículas virais foi feita por plaqueamento em dupla camada. O cálculo de Burst size foi feito pela divisão do título de Unidades Formadoras de Placas (PFU) obtidos ao final do primeiro ciclo de infecção e a PFU inoculada no início do experimento.

O termo Multiplicity of Infection representa a proporção de partículas virais em relação ao número de bactérias presentes no meio. Sendo assim, um MOI de 0,001, representa 1000 vezes menos fagos do que bactérias para realizar determinado ensaio.

1.3.4- Determinação do espectro de hospedeiros

A determinação de hospedeiros do fago vB_EcoM_UFV9 foi feita a partir de testes de gotejamento, como descrito em Beck *et al.*, 2009. Os gêneros bacterianos testados como potenciais hospedeiros (ver tabela 1) foram escolhidos para avaliar a especificidade e a capacidade infectiva do vB_EcoM_UFV9, tanto de forma intra-específica quando inter-específica, mesmo em um grupo de bactérias correlatas, como é o caso dos gêneros escolhidos, todos considerados enterobactérias. Os prováveis hospedeiros foram ativados em meio líquido LB, sem agitação e mantidos na temperatura de 37°C *overnight*. Uma alíquota de 700 µL de cada uma das bactérias ativas foi misturada à 5mL de meio LB semi-sólido e vertido numa placa de petri com ágar sólido. Após a solidificação do ágar semi-sólido, 10 µL de uma suspensão de fagos concentrada foi adicionada ao meio da placa. A presença de um halo de inibição do crescimento bacteriano no local onde a suspensão do vB_EcoM_UFV9 foi gotejado indica que aquele hospedeiro pode ser infectado pelo fago de interesse, sendo portanto, o resultado positivo do teste.

Tabela 1: Gêneros bacterianos testados como prováveis hospedeiros do fago vB_EcoM_UFV09.

Bactéria	Identificação ATCC
<i>Escherichia coli</i> 30	-
<i>Escherichia coli</i> K12	-
<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	13076
<i>Serratia marcescens</i>	-
<i>Enterobacter cloacae subsp clocae</i>	13047
<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	33591
<i>Bacillus cereus</i>	-
<i>Citrobacter freundii</i>	8090
<i>Shigella flexneri</i>	12022

1.3.5- Extração do genoma viral

A extração do genoma viral foi feita com base no protocolo descrito por Sambrook and Russel, 2001. Brevemente, foi adicionada proteinase K na concentração final de 50 µg/mL e SDS na concentração final de 0,5% (m/v) em uma alíquota de 500 µL do fago isolado. A mistura foi incubada por uma hora, à 56°C. Após esse período, 500 µL de fenol tamponado pH 8.0 foram adicionados à mistura, que foi posteriormente submetida à centrifugação (8000 xg, por 5 minutos). Após esse processo, a fase aquosa foi recolhida e transferida para outro tubo. Igual volume de uma solução 1:1 de clorofórmio/fenol foi adicionada ao tubo. Após nova centrifugação, a fase aquosa foi recuperada. Igual volume de clorofórmio foi adicionado. Novamente, a mistura foi centrifugada e a fase aquosa transferida para um novo tubo. Etanol na proporção 2:1 foi adicionado e a solução estocada à -20°C por 12 horas. Após esse período, o tubo foi centrifugado a 15.000 xg por 20 minutos. O etanol foi descartado e, após evaporar totalmente, o pellet foi ressuspensionado em 20 µL de água ultrapura.

1.3.6- Identificação e caracterização do bacteriófago vB_EcoM_UFV9

Após extração, o genoma viral foi enviado para sequenciamento *shotgun* na empresa Molecular research DNA (<http://www.mrdnalab.com/>), utilizando a plataforma Illumina MiSeq, com cobertura de 10 milhões de *reads, paired-end*. A qualidade dos dados brutos foi avaliada utilizando o software FastQC e a montagem do genoma feita pelo software CLC genomics Workbench.

O genoma foi anotado utilizando o software RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology <http://rast.theseed.org/FIG/rast.cgi>). As sequências referentes à

proteínas hipotéticas foram submetidas ao software Pfam (<https://pfam.xfam.org/>) para que seus domínios fossem identificados.

1.3.7- Análises de bioinformática

A busca por enzimas do tipo hidrolase, com potencial biotecnológico já estabelecido, foi feita pelo programa PHYpred (DING *et al.*, 2016). A provável ação delas sobre o peptidoglicano bacteriano foi predita pelo software Hype (SHARMA, *et al* 2016) e a busca de enzimas semelhantes foi feita pelo Blastp. Para a determinação da presença de prováveis sequências de RNA transportadores (tRNA) no genoma do bacteriófago, foi utilizado o programa tRNAscan-SE (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>)(LOWE; EDDY, 1997). A análise de prováveis hospedeiros foi feita *in silico*, pelo Software HostPhinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/HostPhinder/>) (VILLARROEL *et al.*, 2016). A presença de genes que conferem resistência à antibióticos e genes de virulência foi feita utilizando os programas “ResFinder” e “VirulenceFinder” respectivamente (KLEINHEINZ, JOENSEN, LARSEN, 2014). O mapa do genoma foi elaborado pelo programa CG View Server (GRANT; STOTHARD, 2008). Um megablast comparativo foi realizado para identificar a similaridade do vB_EcoM_UFV09 com o genoma de outros fagos já descritos, utilizando a plataforma do NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>). A análise comparativa entre as regiões de fibra da cauda do fago que determinam o espectro de hospedeiro foi feita pelo programa “PredictProtein” (<https://www.predictprotein.org/>). Por fim, foi realizada uma análise filogenética com as principais espécies tipo da família *Myoviridae*, (ordem *Caudovirales*) para avaliar a classificação filogenética do vB_EcoM_UFV9. O programa utilizado para a construção da árvore filogenética foi o VICTOR, (<https://ggdc.dsmz.de/victor.php>) (MEIER-KOLTHOFF; GO, 2017).

1.4- Resultados

1.4.1- Características Biológicas do bacteriófago vB_EcoM_UFV09

A análise de microscopia eletrônica de transmissão mostrou que fago possui estrutura complexa, com capsídeo icosaédrico e cauda contrátil. Mede aproximadamente 170 nm de comprimento e apresenta a morfologia típica dos bacteriófagos da família Myoviridae, ordem Caudovirales (Figura 1).

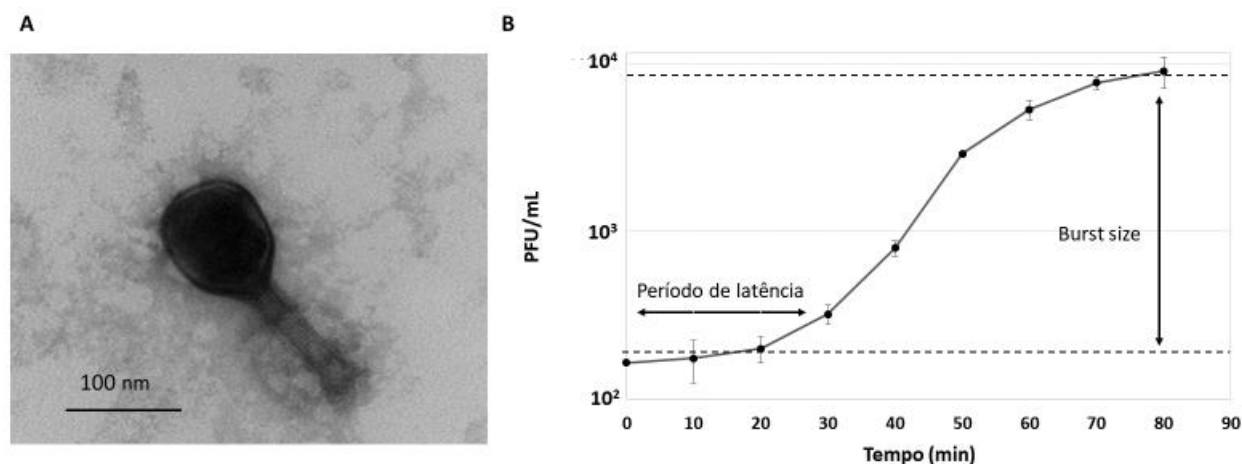


Figura 1: Microscopia eletrônica de varredura e curva de One - Step Growth do bacteriófago vB_EcoM_UFV09. **A)** partícula viral com morfologia característica dos fagos pertencentes à família *Myoviridae*. **B)** Curva de one-step growth mostrando a relação entre o número de unidades formadoras de placas (PFU) por mL, ao longo do período do experimento. O MOI utilizado foi de 0,001.

As placas de lise desse fago, resultantes do plaqueamento por dupla camada, medem cerca de 0,9 mm de diâmetro. As partículas do vB_EcoM_UFV09 apresentam resistência ao clorofórmio e se mantêm viáveis após armazenamento em temperatura de 4°C.

A curva de One Step Growth mostrou que o período de latência do vB_EcoM_UFV09 é de aproximadamente 30 minutos, com liberação de novas progênies virais a cada 40 minutos. Calcula-se que o Burst size do fago seja por volta de 50, ou seja, a cada ciclo de infecção iniciado por uma partícula viral, aproximadamente 50 novas partículas virais são formadas e liberadas no meio (Figura 1B). O teste de gotejamento para a avaliação de espectro de hospedeiros foi positivo apenas para a estirpe bacteriana *Escherichia coli* K12.

1.4.2- Análise genômica do bacteriófago vB_EcoM_UFV09

O fago vB_EcoM_UFV09 contém genoma linear, de DNA dupla fita, com 165.759 pares de base (pb), com conteúdo GC de 35,4%, diferente do conteúdo de seu hospedeiro, de aproximadamente 52%. A baixa concentração de conteúdo GC do vB_EcoM_UFV09 é uma

característica associada aos fagos do gênero T4. Das 267 *open reading frames* (ORFs) presentes no genoma, 108 (40,4%) correspondem a proteínas fágicas com a anotação funcional específica não identificada. As 161 ORFs restantes foram identificadas e divididas em grupos funcionais: 50 (18,7%) codificam proteínas estruturais; 106 (39%) codificam proteínas relacionadas ao metabolismo de ácidos nucleicos e à replicação do DNA e 5 (1,9%) codificam proteínas relacionadas ao processo de infecção e lise do hospedeiro. A anotação dos genes e a organização do genoma do vB_EcoM_UFV09 está ilustrado na figura 3.

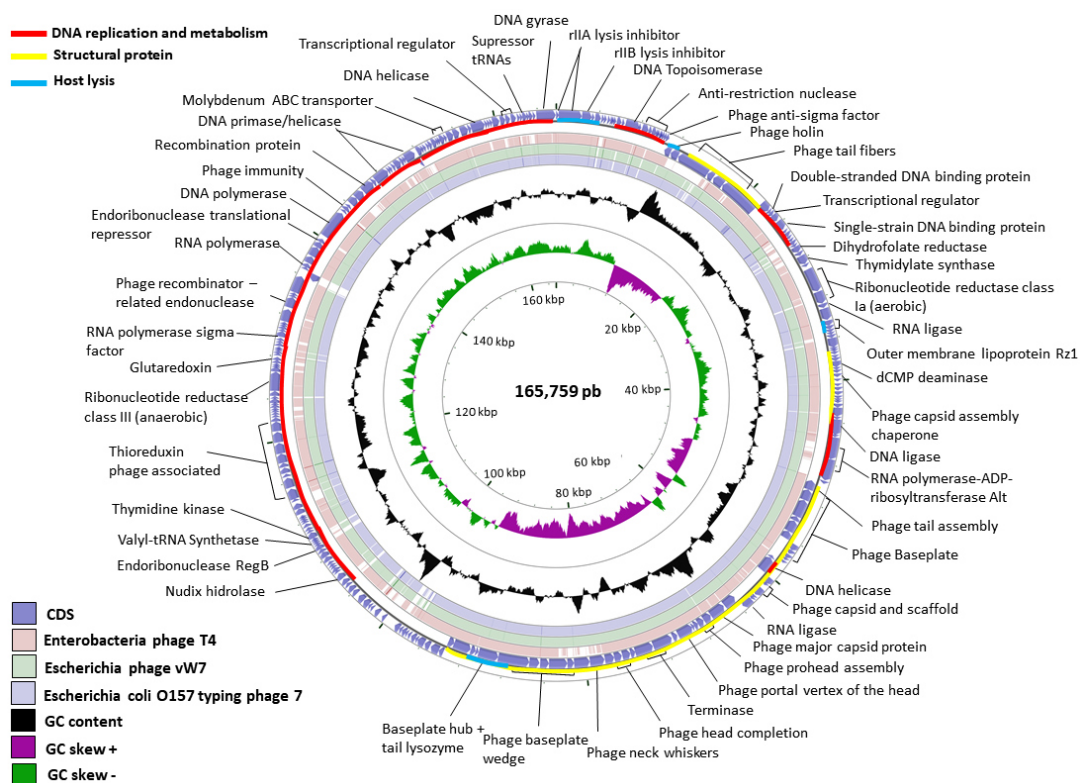


Figura 2: Mapa genômico do fago vB_EcoM_UFV09. Proteínas hipotéticas não estão representadas na figura. Os módulos funcionais estão salientados na figura por barras coloridas.

A predição *in silico* de prováveis hospedeiros indicou que o vB_EcoM_UFV09 poderia infectar as espécies bacterianas *Escherichia coli* (E-value: $6,5e^{-1}$), *Shigella flexneri* (E-value: $5,4e^{-1}$), *Shigella sonnei* (E-value: $2,1e^{-2}$) e *Yersinia pestis* (E-value: $5,4e^{-1}$). No entanto, como citado anteriormente, embora o programa tenha predito essas espécies como possíveis hospedeiras, o teste de gotejamento foi positivo apenas para a cepa de *Escherichia coli* K12.

Não foram identificados no genoma a presença de genes de virulência ou que confirmam resistência à antibióticos. Quanto a busca por enzimas com potencial biotecnológico, identificamos 114 ORFs com domínio hidrolase. A partir delas, a procura por enzimas

capazes de degradar o peptidoglicano indicou que a gp115 do vB_EcoM_UFV09 é uma amidase do tipo N-acetylmuramoil-L-alanina, capaz de clivar as ligações glicano-peptídicas da parede celular. Uma análise de similaridade indicou que essa é uma enzima comum em bacteriófagos, semelhante à gp12 do fago T4, e compõe as fibras curtas da cauda. Essa enzima também exibe alta taxa de conservação de aminoácidos, visto que apresentou 100% de similaridade com sequências presentes em outros fagos, não necessariamente correlatos ao vB_EcoM_UFV09.

A predição *in silico* indicou a presença de tRNAs que se ligam tanto a aminoácidos hidrofóbicos quanto aos que possuem carga nula. Esses tRNAs tem afinidade com os seguintes aminoácidos: Leucina, Prolina, Metionina, Glicina, Serina, Treonina, Tirosina, Asparagina, Glutamina, Arginina e Histidina.

A busca de fagos correlatos, feita a partir do Megablast mostrou que 66 genomas tiveram no mínimo 95% de similaridade. Entre eles estão presentes fagos já bem conhecidos, como o AR1, RB55 e o T4 clássico. Dentre os mais similares, os fagos “*Escherichia coli* O157 typing phage 7” (COWLEY *et al*, 2015). e “*Escherichia phage wV7*” (KROPINSKI, *et al*, 2012) apresentaram 97% de similaridade e 97% de cobertura com o vB_EcoM_UFV09, sendo ambos isolados a partir da mesma espécie de hospedeiro. Essa análise reforçou que o VB_EcoM_UFV09 pertence à ordem *Caudovirales*, família *Myoviridae*, permitindo também a classificação dele dentro da subfamília *Tevenvirinae*, gênero T4virus. Os vírus classificados nesse gênero são comumente chamados “*T4 like*”.

A comparação do gene que codifica a gp37 (subunidade maior da porção distal das fibras da cauda) do fago T4 com a mesma região do vB_EcoM_UFV09 e dos fagos Sf23 e AR1 está presente na figura 3. A gp 37 é uma das principais proteínas responsáveis pelo reconhecimento do receptor da célula hospedeira, e determina quais estirpes bacterianas o fago está apto a infectar, sendo portanto, essencial no processo de infecção e de determinação de hospedeiros (MILLER *et al*, 2003).

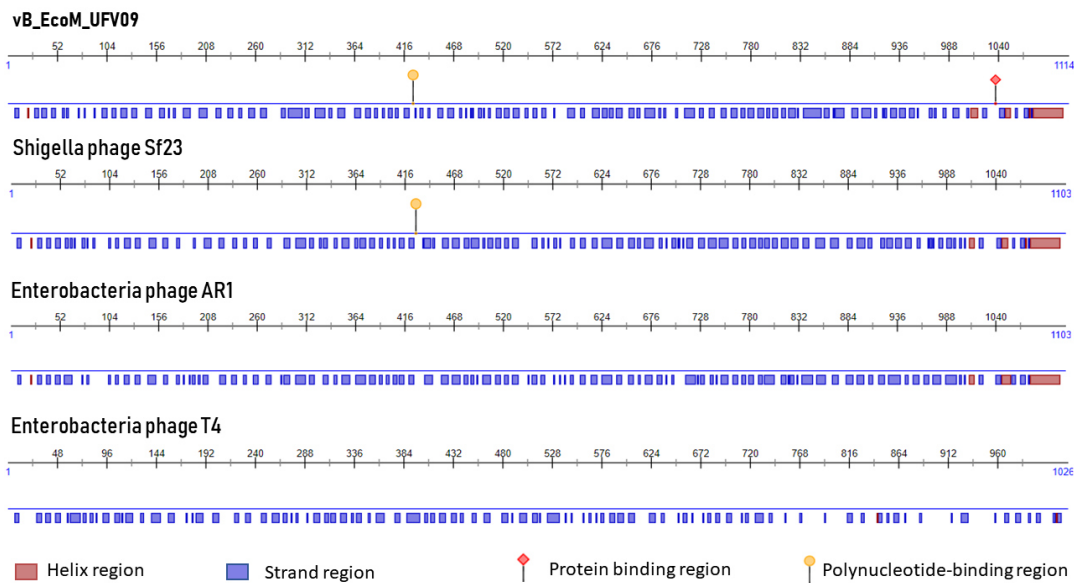


Figura 3: Sequências referentes à subunidade maior da porção distal das fibras da cauda, dos fagos vB_EcoM_UFV09, Shigella phage Sf23, Enterobacteria phage AR1 e Enterobacteria phage T4.

A sequência referente ao fago vB_EcoM_UFV09 apresentou prováveis regiões capazes de formar estruturas secundárias do tipo hélice, além de locais de ligação de polinucleotídeos e de proteínas. Embora na sequência correspondente ao fago AR1 não tenha sido identificado locais de ligação de proteínas ou de polinucleotídeos, ela apresentou 85,3 % de similaridade com o vB_EcoM_UFV09 e manteve as mesmas regiões de hélice. O Shigella phage Sf23, que diferentemente dos fagos citados até aqui não foi isolado em *E.coli*, apresentou 85,6 % de similaridade na região da gp 37, e foi a que se mostrou mais semelhante ao vB_EcoM_UFV09, preservando inclusive a região de ligação de polinucleotídeos. Entretanto, a sequência referente à gp37 do fago T4 apresentou apenas 35% de similaridade com a do vB_EcoM_UFV09 e não apresentou regiões de hélice.

Os dados obtidos no Megablast foram utilizados como base para a elaboração de uma árvore filogenética (Figura 4), contendo genomas sabidamente correlatos com o vB_EcoM_UFV09 e genomas provenientes de diferentes gêneros da família *Myoviridae*.

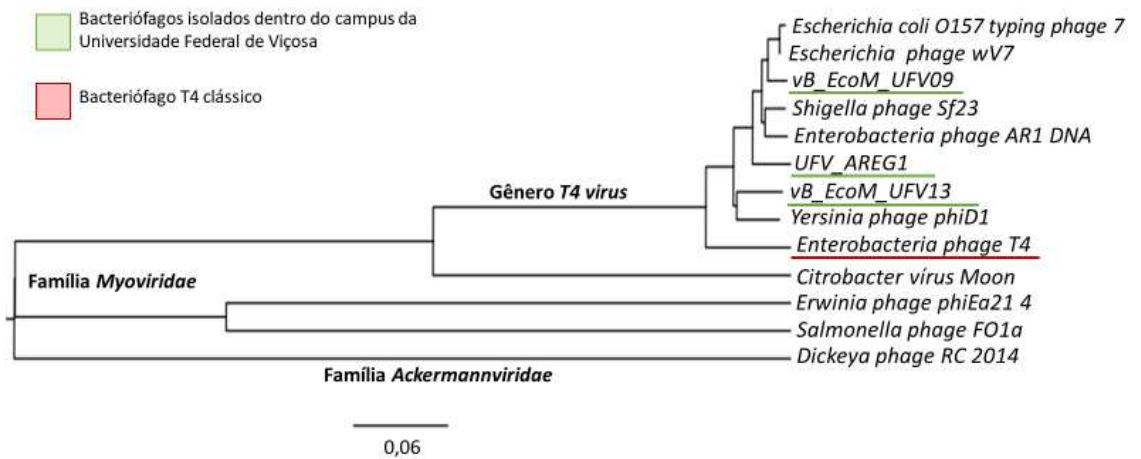


Figura 4: Árvore filogenética formada a partir de genomas tipo da família *Myoviridae*.

O fago vB_EcoM_UFV09 foi agrupado num clado contendo os fagos “*Escherichia coli* O157 typing phage 7” e “*Escherichia* phage wV7” como grupo-irmão. Esse clado também se mostrou muito semelhante ao que é composto pelos genomas de “*Shigella* phage Sf23” e “*Enterobacteria* phage AR1”, mostrando que o vB_EcoM_UFV09 teve maior similaridade com fagos isolados em outro continente (tanto o *Escherichia coli* O157 typing phage 7 quanto o *Escherichia* phage wV7 foram isolados no Canadá), do que com fagos T4-like isolados na mesma localidade.

1.5- Discussão

Atualmente, 1186 genomas disponíveis no NCBI correspondem a membros da família *Myoviridae*, onde 202 (17%), são pertencentes à subfamília *Tevenvirinae*. Embora a morfologia do fago vB_EcoM_UFV09 já fornecesse indícios de que poderia ser classificado na família *Myoviridae* (CHRISTIE; DOKLAND, 2012; ROHWER; EDWARDS, 2002), as análises genômicas e filogenéticas possibilitaram a classificação deste fago a nível genérico, identificando-o como um fago T4-like.

O fago vB_EcoM_UFV09 apresentou um Burst size de 50 novas partículas por célula infectada, um número abaixo do esperado, uma vez que o burst size de fagos do gênero T4 normalmente varia entre 100 e 300 (CHOI *et al.*, 2010; MILLER *et al.*, 2003). Embora o One-Step Growth seja uma metodologia já estabelecida para prever a progênie viral a cada ciclo de infecção, o valor do burst size pode ser influenciado pelo tamanho da célula infectada. Quanto maior a célula, maior o seu maquinário celular e melhor a produção de proteínas, tornando a produção de novas partículas virais conseqüentemente mais efetivas (HADAS *et al.* 1997). Choi *et al.*, em 2010 selecionou a partir de centrifugação, células de *E. coli* com menor densidade, considerando que elas seriam menores. Os autores infectaram as células com o fago T4 e obtiveram um burst size próximo de 30. Dessa forma, acreditamos que o burst size do vB_EcoM_UFV09 possa ter sido influenciado pelo tamanho celular do isolado bacteriano utilizado no presente trabalho.

O fago T4 clássico codifica 8 tRNAs, e compartilha 7 deles (Arg, Gly, Leu, Pro, Ser e Thr) com o vB_EcoM_UFV09. Não se sabe ao certo a função dos tRNAs em bacteriófagos, embora JUN *et al.* em 2016 tenha sugerido uma relação entre um menor tempo de latência e um maior burst size com fagos que apresentam uma grande quantidade de tRNAs no genoma. Embora vB_EcoM_UFV09 codifique 11 tRNAs, não conseguimos detectar essa relação.

A comparação das regiões correspondentes à subunidade maior da porção distal das fibras da cauda (gp37) demonstrou grande similaridade entre o vB_EcoM_UFV09 e o fago de shigella Sf23. Exceto por uma região de ligação de proteínas presentes no vB_EcoM_UFV09 e ausente no Sf23, a sequência se mostra quase idêntica para ambos. A predição de que o vB_EcoM_UFV09 seja capaz de infectar espécies do gênero *Shigella* se mostrou possível num contexto de bioinformática (Figura 3), embora essa capacidade não tenha se confirmado na prática.

A árvore filogenética que avalia as relações do vB_EcoM_UFV09 com outros 13 genomas, incluindo o de fagos isolados na mesma região, apresentou dois clados principais: um com fagos pertencentes ao gênero T4 e outro com genomas que pertencem a família *Myoviridae*, porém pertencentes a outros gêneros. Apesar dos fagos isolados na mesma região terem mostrado uma relação próxima, foi com os fagos Escherichia coli O157 typing phage 7 e Escherichia phage wV7 que o vB_EcoM_UFV09 se mostrou mais semelhante, seguido por Shigella phage Sf23 e Enterobacteria phage AR1. O fato do vB_EcoM_UFV09 ter se mostrado tão próximo a um fago isolado a partir da estirpe bacteriana *E. coli* O157:H7, que é enterohemorrágica, justifica a avaliação dela como uma provável hospedeira.

Algumas das principais características para que um fago possa ser usado na fagoterapia incluem: ciclo de infecção exclusivamente lítico; ser capaz de infectar uma alta quantidade de estirpes de uma espécie bacteriana; se manter íntegro após as metodologias de purificação; suportar bem mudanças ambientais como alterações de pH e temperatura; e não possuir genes que possam aumentar a patogenicidade do hospedeiro (CHAN *et al* 2013).

Embora alguns testes ainda precisem ser feitos com o vB_EcoM_UFV09, como o de susceptibilidade a diferentes temperaturas, pH extremos e a solventes orgânicos, acreditamos que esse fago tenha grande potencial para ser usado na fagoterapia. Só a ausência de genes de patogenicidade e de resistência à antibióticos no genoma do vB_EcoM_UFV09 já é uma perspectiva positiva para seu uso na fagoterapia, uma vez estudos indicam o importante papel dos fagos como agentes transportadores de genes de resistência a antibióticos (COLOMER-LLUCH, JOFRE, MUNIESA, 2011; BROWN-JAQUE, CALERO-CÁCERES, MUNIESA, 2015). Além disso, a alta taxa de similaridade entre o vB_EcoM_UFV09 e fagos capazes de infectar espécies enterohemorrágicas de *E. coli* intensificam ainda mais o potencial dele como fagoterápico.

Com relação as enzimas com impacto no peptidoglicano celular ou na substância exopolissacarídica do biofilme bacteriano, apenas uma hidrolase do tipo amidase foi identificada. Embora essa enzima tenha mostrado alta taxa similaridade com enzimas presentes em outros fagos, e não ser algo exclusivo do vB_EcoM_UFV09, ensaios não publicados mostram que a presença desse fago em um sistema fechado contendo bactérias redutoras de sulfato desestruturou o biofilme já estabelecido e diminuiu a produção de H₂S. Tal fato indica que a clivagem promovida pela amidase do tipo N-acetylmuramoyl-L-alanina presente na cauda do vB_EcoM_UFV09 está sendo efetivo no combate ao biofilme.

1.6- Conclusão

A caracterização do isolado vB_EcoM_UFV09, a nível morfológico e genômico permitiu que ele fosse classificado na família *Myoviridae*, mais especificamente, na subfamília *Tevenvirinae*, gênero T4 virus. Embora não tenham sido identificadas hidrolases raras, com acentuado potencial biotecnológico, há indícios de que a amidase do tipo N-acetylmuramoil-L-alanina presente na cauda do vB_EcoM_UFV09 tenha impacto na formação do biofilme bacteriano. A ausência de genes de lisogenia, característica dos fagos T4-like, ou de genes que aumentam a patogenicidade do hospedeiro, como de virulência e de resistência à antibióticos são qualidades promissoras para a utilização desse isolado na fagoterapia.

1.7- Referências

BACH, S J *et al.* Transmission and control of Escherichia coli O157 : H7 — A review. **Canadian Journal of animal Science** , 2002.

BECK, N K *et al.* Development of a spot-titer culture assay for quantifying bacteria and viral indicators. **Journal of rapid methods and automation in Microbiology** v. 17, n. 206, p. 455–464 , 2009.

BRÜSSOW, Harald. Phage therapy : the Escherichia coli experience. **Microbiology** v. 151, p. 2133–2140 , 2005.

CALLAWAY, Todd R *et al.* Diet , Escherichia coli O157 : H7 , and Cattle : A Review After 10 Years. **Curr. Issues Mol. Biol.** v. 1, n. 979, p. 67–80 , 2007.

CHAN, Benjamin K; ABEDON, Stephen T; LOC-CARRILLO, Catherine. Phage cocktails and the future of phage therapy. **Future Microbiology** p. 769–783 , 2013.

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

CHRISTIE, Gail E.; DOKLAND, Terje. Pirates of the Caudovirales. **Virology**, v. 434, n. 2, p. 210-221, 2012.

CHOI, Charles *et al.* The Effect of Cell Size on the Burst Size of T4 Bacteriophage Infections of Escherichia coli B23. **Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)** v. 14, n. April, p. 85–91 , 2010.

COLOMER-LLUCH, Marta; JOFRE, Juan; MUNIESA, Maite. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. **PloS one**, v. 6, n. 3, p. e17549, 2011.

COSTERTON, J. William *et al.* Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 435-464, 1987.

COWLEY, Lauren A. *et al.* Analysis of whole genome sequencing for the Escherichia coli O157: H7 typing phages. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 271, 2015.

DEMEREK, Milislav; FANO, Ugo. Bacteriophage-resistant mutants in Escherichia coli. **Genetics**, v. 30, n. 2, p. 119, 1945.

DING, Hui *et al.* PHYPred: a tool for identifying bacteriophage enzymes and hydrolases. **Virologica Sinica** p. 1–3 , 2016.

ENDERSEN, Lorraine *et al.* Phage therapy in the food industry. **Annual review of food science and technology**, v. 5, p. 327-349, 2014.

FISCHETTI, Vincent A. Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives. **Trends in microbiology**, v. 13, n. 10, p. 491-496, 2005.

FRUCIANO, 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.

GRANT, Jason R.; STOTHARD, Paul. The CGView Server: a comparative genomics tool for circular genomes. **Nucleic acids research**, v. 36, n. suppl_2, p. W181-W184, 2008.

GOLKAR, Zhabiz; BAGASRA, Omar; PACE, Donald. Bacteriophage therapy: A potential solution for the antibiotic resistance crisis. **Journal of Infection in Developing Countries** v. 8, n. 2, p. 129–136 , 2014.

HADAS, Hilla; EINAV, Monica; ZARITSKY, Arie. Bacteriophage T4 development depends on the physiology of its host Escherichia coli. **Microbiology** v. 143, p. 179–185 , 1997.

HYMAN, Paul; ABEDON, Stephen T. Bacteriophage host range and bacterial resistance. In: **Advances in applied microbiology**. Academic Press, p. 217-248, 2010.

JUN, Jin Woo et al. Bacteriophage application to control the contaminated water with Shigella. **Scientific reports**, v. 6, p. 22636, 2016.

KEEN, Eric C. Phage therapy : concept to cure. **Frontiers in Microbiology** v. 3, n. July, p. 1–3 , 2012.

KLEINHEINZ, Kortine Annina; JOENSEN, Katrine Grimstrup; LARSEN, Mette Voldby. Applying the ResFinder and VirulenceFinder web-services for easy identification of acquired antibiotic resistance and E. coli virulence genes in bacteriophage and prophage nucleotide sequences. **Bacteriophage**, v. 4, n. 2, p. e27943, 2014.

KROPINSKI, Andrew M. et al. Escherichia coli O157: H7 typing phage V7 is a T4-like virus. **American Society of Microbiology**. 2012.

KUMAR, C. Ganesh; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International journal of food microbiology**, v. 42, n. 1-2, p. 9-27, 1998.

LOWE, Todd M; EDDY, Sean R. tRNAscan-SE : a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. v. 25, n. 5, p. 955–964 , 1997.

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.

MEIER-KOLTHOFF, Jan P.; GÖKER, Markus. VICTOR: genome-based phylogeny and classification of prokaryotic viruses. **Bioinformatics**, v. 33, n. 21, p. 3396-3404, 2017.

MILLER, Eric S. et al. Bacteriophage T4 genome. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 67, n. 1, p. 86-156, 2003.

PANOS, G Z; BETSI, G I; FALAGAS, M E. Systematic review : are antibiotics detrimental or beneficial for the treatment of patients with Escherichia coli O157 : H7 infection ? **Alimentary Pharmacology & Therapeutics Systematic** v. 24, n. June, p. 731–742 , 2006.

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.

ROHWER, Forest; EDWARDS, Rob. The Phage Proteomic Tree : a Genome-Based Taxonomy for Phage. **Journal of Bacteriology** v. 184, n. 16, p. 4529–4535 , 2002.

RUSSELL, Richard L. Comparative genetics of the T-even bacteriophages. **Genetics** n. Gb 3930, p. 967–988 , 1974.

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

SHARMA, Ashok K. et al. Prediction of peptidoglycan hydrolases-a new class of antibacterial proteins. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 411, 2016.

VILLARROEL, Julia et al. HostPhinder: a phage host prediction tool. **Viruses**, v. 8, n. 5, p. 116, 2016.

YANG, Chaojie et al. Characterization and genomic analysis of SFPH2, a novel T7virus infecting Shigella. **Frontiers in microbiology**, v. 9, 2018.

WOMMACK, K. Eric et al. Methods for the isolation of viruses from environmental samples. **In: Bacteriophages**. Humana Press, 2009. p. 3-14.

Capítulo 2 – Otimização da produção do bacteriófago EcoM-UFV9 em diferentes fontes de Carbono.

2.1- Resumo

A fagoterapia consiste no uso de bacteriófagos (vírus que infectam bactérias) no controle do crescimento de um determinado grupo microbiano, a partir da lise celular desencadeada pelo processo de infecção viral. Embora a fagoterapia venha retomando seu espaço no tratamento de doenças e problemas ambientais causados por bactérias, há ainda a possibilidade de utilização de enzimas fágicas como as depolimerases e lisinas, que apresentam grande potencial no combate ao biofilme bacteriano. Quando as células estão em um arranjo de biofilme, elas se tornam muito mais resistente à ação de biocidas, e causam grandes prejuízos na área industrial e hospitalar. Apesar de todo o potencial dos bacteriófagos como agentes supressores do crescimento bacteriano, pouco se discute sobre a otimização de partículas virais para o uso desses organismos em larga escala. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a progênie do fago vB_EcoM_UFV09 em sete meios de cultura (meio rico LB e meio mínimo M9 com as fontes de carbono: acetato, ácido lático, piruvato, glicerol, succinato e glicose) juntamente com a influência dos parâmetros de cultivo temperatura, tempo de incubação, agitação e *Multiplicity of infection* (MOI) a partir da metodologia de Delineamento de Composto Central Rotacional (DCCR). Os resultados indicaram que os parâmetro de cultivo influenciaram na produção viral de forma distinta em cada uma das fontes de carbono, e que alguma delas se mostraram insensíveis a esses estímulos. Acreditamos que isso ocorra pelo estado fisiológico sobrecarregado da célula bacteriana em crescer num meio com fontes de carbonos mais difíceis de se obter energia. A determinação da melhor condição de crescimento para a otimização da produção do vB_EcoM_UFV09 levou em conta a viabilidade econômica da fonte de carbono, a estabilidade da fonte no meio de cultivo e o impacto dos parâmetros de cultivo na produção da progênie viral.

2.2- Introdução

A fagoterapia consiste na utilização de bacteriófagos, também chamados de fagos, no controle do crescimento bacteriano, em decorrência da lise celular acarretada pelo processo de infecção viral (KEEN, 2012). Assim que os fagos foram descritos, de maneira independente por Frederick Twort em 1915 e Felix d'Herelle em 1917, eles rapidamente começaram a ser usados no controle de doenças bacterianas, tais como disenterias, febre tifoide e cólera (FRUCIANO; BOURNE, 2007). Porém, com a descoberta dos antibióticos e o fato dos coquetéis fágicos apresentarem relativa inconsistência no tratamento dos pacientes, a fagoterapia foi deixada de lado (ENDERSEN *et al*, 2014; SKURNIK; STRAUCH, 2006).

Essa inconsistência pode ser associada ao pouco conhecimento tanto da relação vírus-hospedeiro, quanto dos ciclos de infecção virais que os pesquisadores possuíam quando a fagoterapia começou a ser utilizada (KEEN, 2012). Embora a aplicação dos fagos para fins terapêuticos tenha diminuído, os estudos envolvendo bacteriófagos continuaram, e grandes descobertas da biologia molecular podem ser associadas à eles, tais como: a determinação dos ciclos de infecção virais, a descoberta do mRNA e mecanismos de reparo do DNA, Dentre esses fagos, o T4 é um dos mais estudados (MILLER *et al*, 2003).

Devido ao aumento de cepas bacterianas resistentes à ação dos antibióticos, a necessidade de metodologias alternativas para o controle do crescimento de bactérias patogênicas ressurgiu, fazendo com que a fagoterapia voltasse a ser considerada uma provável alternativa para esse fim (GOLKAR *et al*, 2014). Enquanto aplicação de bacteriófagos para tratamento em humanos ainda esteja voltando a ser testada (WRIGHT *et al.*, 2009), a utilização deles no controle de doenças veterinárias, como a mastite e problemas ambientais associados à formação do biofilme tem sido feita de forma recorrente e com ótimos resultados (BELGINI *et al.*, 2014; DUARTE *et al.*, 2018; DUARTE *et al.*, 2016).

Apesar da lise celular decorrente do processo de infecção ser principal foco da fagoterapia, o potencial de algumas enzimas fágicas também vem sendo investigado. Hidrolases como as depolimerases e lisinas apresentam grande potencial no combate ao biofilme bacteriano, que causa grandes prejuízos na área industrial e hospitalar (CHAN, ABEDON, 2015, FISCHETTI, 2005). O biofilme é composto por uma matriz exopolissacarídica (EPS), secretado pelas próprias células bacterianas, que auxiliam a fixação delas à uma superfície (COSTERTON *et al.* 1987). Quando as células estão em um arranjo de biofilme, elas se tornam muito mais resistente à ação de biocidas, uma vez que o EPS forma

uma barreira física que protege as células desses compostos (COSTERTON *et al.* 1987; STEWART, COSTERTON, 2001; KUMAR, ANAND, 1998).

Os biofilmes são um problema em diversos contextos, porém, nesse trabalho iremos correlacionar os biofilmes bacterianos formados por organismos redutores de sulfato em indústrias petrolíferas e a ação dos bacteriófagos, numa aplicação ambiental.

Procaríotos Redutores de Sulfato (PRS), são um grupo de organismos heterofiléticos, com representantes tanto do domínio Archaea quanto Bacteria, capazes de utilizar o sulfato comoceptor final de elétrons durante a respiração, e que tem o sulfeto de hidrogênio (H₂S) como principal produto desse metabolismo (CASTRO *et al.*, 2000; BARTON, HAMILTON, 2007; RABUS *et al.*, 2015).

Esse grupo de micro-organismos chama especial atenção em plataformas petrolíferas. Eles estão normalmente presentes na água do mar, que pode ser injetada nos poços quando a pressão natural deles se extingue, num processo denominado recuperação secundária do petróleo. A água proveniente desse processo é chamada “água de produção” e precisa ser armazenada nas plataformas petrolíferas até ser tratada. O armazenamento da água de produção nos tanques cria um ambiente que se torna rapidamente anóxico e rico em compostos sulfurados, muito propício para o crescimento de PRS (CURBELO, 2006; GIEG, 2011; GRABOWSKI *et al.*, 2005).

Esses organismos formam biofilmes nos tanques e nos tubos das plataformas, sendo os principais responsáveis pelo processo de corrosão biogênica em ambientes relacionados ao petróleo. A presença deles também acentua a acidificação do meio e aumenta a concentração de compostos sulfurados no petróleo, um fenômeno denominado “*souring*”, que resulta na diminuição do seu valor de mercado (CURBELO, 2006; GIEG, 2011; GRABOWSKI *et al.*, 2005). O uso de biocidas é uma opção na tentativa de controlar o crescimento de PRS, porém, a resistência microbiana a esses compostos é um agravante que pode se desenvolver, particularmente em biofilmes tratados. Há ainda problemas relacionados com a toxicidade e a permanência dessas substâncias nos efluentes mesmo após as etapas de tratamento (FRAISE, 2002; STEWART, COSTERTON, 2001).

Por conta disso, a utilização de bacteriófagos pode ser uma interessante alternativa para o controle do crescimento de PRS. Embora o grupo conte com mais de 30 gêneros, e o isolamento de bacteriófagos líticos para cada um deles se torne um problema, a utilização de

bacteriófagos que produzam enzimas capazes de impedir ou desestruturar o biofilme bacteriano se mostrou um tratamento promissor em estudos recentes do nosso grupo de pesquisa (CHAN B. K., ABEDON S. T., 2015; PARAISON S. *et al* 2014; DUARTE V. S., 2018; BELGINI D. R. B, 2014).

Uma das principais limitações do uso de bacteriófagos em sistemas ambientais é a necessidade de uma quantidade de partículas virais exponencialmente maior do que se é produzido normalmente em laboratório. Dessa forma, estudos e metodologias que visem otimizar e tornar economicamente viável a produção de bacteriófagos em larga escala são de extrema importância e representam uma demanda crescente.

A obtenção de novas partículas virais envolve tanto o cultivo do hospedeiro quanto do vírus. No caso dos bacteriófagos, é necessário o cultivo das células bacterianas antes do processo de propagação em si. O meio Luria Bertani (LB) é um meio rico e complexo, muito utilizado para o cultivo de enterobactérias, como é o caso da *Escherichia coli*. Esse meio já possui diversos precursores que são utilizados pela célula, que por conta disso, consegue crescer de forma excepcionalmente rápida com o tempo de geração de 20 minutos na fase exponencial de crescimento (MILLER *et al*, 2003; SEZONOV; ARI, 2007). Apesar das vantagens de cultivo, se uma propagação viral em larga escala fosse realizada em meio LB, os custos operacionais seriam altíssimos.

Uma alternativa para esse problema, seria a utilização de outro meio de cultivo para o crescimento das células bacterianas. O meio mínimo M9 é composto basicamente por sais e íons, tais como fosfato de sódio dibásico, fosfato monopotássico, cloreto de sódio, cloreto de amônio, cloreto de cálcio e sulfato de magnésio, além de uma fonte de carbono. Essa alternativa só é possível devido à grande capacidade metabólica da bactéria *E. coli*, que é capaz de sintetizar todos seus precursores celulares mesmo crescendo em um meio oligotrófico como é o caso do meio M9, apesar de não apresentar a mesma velocidade de crescimento de quando é cultivada em um meio rico (LI *et al.*, 2014).

A tabela 1 simula os custos de produção de diferentes meios de cultivo, como o meio rico LB e o meio mínimo M9 com diferentes fontes de carbono. De acordo com os preços cotados, o cultivo em meio LB seria aproximadamente 30 vezes mais dispendioso do que o cultivo nos meio M9 utilizando glicose e acetato de sódio como fonte de carbono.

Tabela 1: Valores em reais referentes as fontes de carbono utilizadas. O * significa que não há como determinar a concentração das fontes de carbono utilizadas no meio LB, utilizamos como base para o cálculo as 25g/L recomendada pelo fabricante.

Fonte de Carbono	Preço	Preço por litro/ [0,4%]
LB broth, Miller	R\$ 1090,00 / 1Kg	R\$ 27,25*
Meio M9 sem fonte de carbono	-	R\$ 0,72
Ácido lático	R\$ 59,00/ 1L	R\$ 0,23
Acetato de Sódio	R\$ 31,50 / 1 Kg	R\$ 0,126
Glicose	R\$ 33,50 / 1 Kg	R\$ 0,135
Glicerol	R\$ 43,90 / 1 L	R\$ 0,175
Piruvato de Sódio	R\$ 47,30 / 25 g	R\$ 7,56
Succinato de sódio	R\$ 161,80 / 100g	R\$ 6,44

Além da utilização de diferentes fontes de carbono e meios de cultura, outros parâmetros operacionais podem ser testados para se alcançar as condições ótimas de cultivo, tais como temperatura, agitação, tempo de incubação e, no caso da produção viral, Multiplicity of Infection, que é a proporção de partículas virais por células bacterianas adicionadas durante o processo de otimização.

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo analisar as melhores condições de cultivo para a produção de partículas virais de um fago da família *Myoviridae*, T4-like, denominado vB_EcoM_UFV09, que em estudos anteriores, se apresentou eficaz na diminuição do biofilme bacteriano formado em um sistema de fluxo contínuo (looping). Dessa forma, foram avaliados sete meios de cultivo: seis meios mínimo M9, que diferiram entre si pela fonte de carbono utilizada (ver tabela 1), e o meio LB (controle). Utilizando-se ainda da estratégia de Delineamento de Composto Central Rotacional (DCCR) a influência de 4 variáveis de produção foi avaliada. São elas: Temperatura (Te), Tempo de incubação (Ti) Agitação (Ag) e *Multiplicity of Infection* (MOI).

2.3- Metodologia

2.3.1- Linhagem bacteriana e Bacteriófago vB_EcoM-UFV9

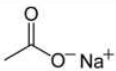

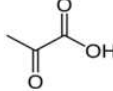
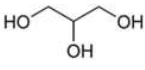
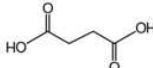
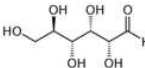
Para a multiplicação do fago vB_EcoM-UFV9 foi utilizada a linhagem bacteriana *Escherichia coli*, isolado 30, cedida pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

(EMBRAPA). O bacteriófago EcoM-UFV9, utilizado em todos os testes subsequentes, foi isolado a partir de amostras da rede de esgoto da cidade de Viçosa/MG. Seu genoma e o potencial para a utilização na fagoterapia foi avaliado no capítulo anterior. Esse isolado faz parte do acervo de micro-organismos do Laboratório de Imunovirologia Molecular (LIVM) da Universidade Federal de Viçosa.

2.3.2- Meio mínimo M9 e Luria Bertani Broth (LB)

Os meios utilizados foram preparados seguindo o protocolo descrito por Sambrook and Russel, 2001, com leves adaptações (Anexo 2). O meio mínimo M9 é composto basicamente por sais e íons, tais como fosfato de sódio dibásico, fosfato monopotássico, cloreto de sódio, cloreto de amônio, cloreto de cálcio e sulfato de magnésio. A concentração da fonte de carbono utilizada foi de 0,4% p/v. O meio LB é composto por extrato de levedura, cloreto de sódio e peptona, sendo considerado um meio rico. No total, foram avaliados sete meios de cultivo: seis meios mínimo M9, que diferiram entre si pela fonte de carbono utilizada (Tabela 1), e o meio LB (controle), que é normalmente utilizado para o crescimento de bactéria *E. coli*. Para facilitar a nomenclatura, durante este estudo as fontes de carbono serão citadas apenas como Acetato, Ácido Lático, Piruvato, Glicerol, Succinato e Glicose.

Tabela 2: Fórmula estrutural e número de carbono que compõem as moléculas utilizadas como fonte de carbono dos meios M9 presentes nesse trabalho.

Fonte de Carbono	Número de Carbonos	Fórmula estrutural
Acetato de sódio	2	
Ácido lático	3	
Ácido pirúvico	3	
Glicerol (Glicerina)	3	
Ácido succínico	4	
Glicose	6	

2.3.4- Avaliação da cinética de crescimento bacteriano

A bactéria *E. coli* 30 foi cultivada nos meios M9 e LB com o objetivo de avaliar a velocidade de crescimento desse isolado. Para a avaliação da cinética do crescimento bacteriano, uma alíquota da bactéria ativada overnight foi adicionada a um tubo de 50 mL de forma que a DO₆₀₀ fosse 0,1 e o volume final 7mL. Alíquotas de 300 µL foram recolhidas em diferentes tempos para a leitura da DO₆₀₀.

2.3.5- Delineamento de Composto Central Rotacional com 4 variáveis

Para a avaliação da produção de partículas virais em diferentes fontes de Carbono e diferentes condições de cultivo, foi utilizado o Delineamento de Composto Central Rotacional (DCCR) que envolveu 4 variáveis: Temperatura (Te), Tempo de incubação (Ti) Agitação (Ag) e *Multiplicity of Infection* (MOI). O delineamento foi composto por 16 combinações possíveis entre os preditores estudados (2⁴), acrescidos de 8 ensaios axiais e 4 repetições de ponto central, totalizando 28 ensaios. O desenho experimental pode ser visto no **anexo 1**.

O termo *Multiplicity of Infection* representa a proporção de partículas virais em relação ao número de bactérias presentes no meio. Sendo assim, um MOI de 0,1 representa a utilização de 10 vezes menos fagos do que bactérias para realizar determinado ensaio.

A faixa de valores estabelecida para os parâmetros selecionados (tabela 2) foi definida com base em estudos prévios (PALIY; GUNASEKERA, 2007a; THAKUR *et al.*, 2010; WARNER; BARKER; PERKINS, 2014).

Tabela 3: Valores utilizados no DCCR para a análise da produção de partículas do fago vB_EcoM_UFV09 em diferentes parâmetros de cultivo e meios de cultura.

Variáveis	Níveis				
	- α	-1	0	+1	+ α
Temperatura (°C)	28	31	34	37	40
Tempo de incubação (h)	4	6	8	10	12
Agitação (rpm)	100	138	175	213	250
MOI	0,00001	0,0001	0,001	0,01	0,1

2.3.6- Montagem dos experimentos de DCCR

Cada fonte de carbono foi considerada uma variável resposta diferente do processo de otimização. Os 28 ensaios definidos no DCCR foram feitos para cada uma das fontes de carbono avaliadas (acetato, glicerol, glicose, ác. lático, piruvato e succinato) e para o meio LB. O inóculo bacteriano foi previamente ativado em cada um dos meios de cultivo, até que atingisse a DO₆₀₀ de aproximadamente 0,7. Em seguida, a bactéria ativada foi adicionada em

tubo de 50 mL, com ajuste de DO_{600} inicial de 0,1 para um volume final de 5mL. Os tubos foram então submetidos às diferentes condições de cultivo previstas pelo DCCR.

2.3.7- Quantificação do título viral

Para a quantificação do título viral ao final do processo de cultivo, foi realizado o plaqueamento por dupla camada seguindo protocolo de Kropinski et al, 2009, com algumas modificações. Desse modo, 100 μ L de amostra foi recolhida de cada tubo de 50 mL e diluições seriadas foram realizadas na proporção de 1:10, em tampão SM (Anexo 2). Das diluições 10^{-6} e 10^{-7} foram retirados 100 μ L, que foram adicionados em tubos de 1,5 mL de forma independente. Nesses tubos também foram adicionados 100 μ L de uma solução estoque contendo a bactéria *E. coli* 30, na DO_{600} de 2,0. O conteúdo de cada um dos tubos de 1,5mL foi então misturado à 5mL de meio LB semi-sólido (0,7% de ágar), e então vertido numa placa de petri, contendo aproximadamente 20mL de meio LB sólido (1,5% de ágar).

2.3.8- Avaliação dos impactos dos parâmetros operacionais de cultivo na produção de partículas virais

A avaliação do impacto dos parâmetros operacionais utilizados no DCCR, bem como a predição das melhores condições de cultivo para cada fonte de carbono, foi feita utilizando o programa Minitab, a partir dos valores de titulação viral obtidos ao final de cada um dos 28 ensaios, nos meios de cultivo utilizados.

2.4- Resultados

2.4.1- Avaliação da cinética de crescimento bacteriano

A cinética de crescimento da bactéria *E. coli* 30 foi semelhante entre os meios avaliados (Figura 1), embora a DO_{600} alcançada tenha sido diferente entre eles. Apresentamos na tabela 3 os valores de μ e a DO_{600} após 24 horas de experimento.

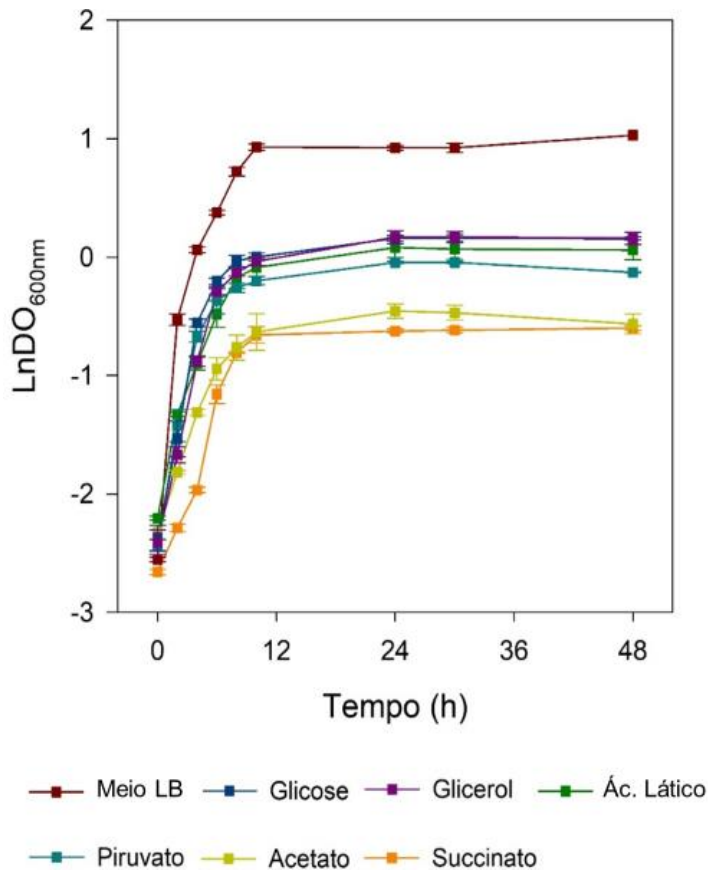


Figura 1: Cinética de crescimento da bactéria *Escherichia coli* 30 em diferentes meios de cultivo.

A bactéria apresentou o maior valor de DO_{600} em LB (mais que o dobro do que nas demais fontes) e o valor da taxa intrínseca de crescimento (μ) nesse meio foi extremamente maior do que os valores observados em meio mínimo, em média, 81% maior. Baseado nos valores de Ln da DO_{600} dos meios M9, observamos que a bactéria apresentou dois padrões de crescimento semelhantes. Glicose, Glicerol, Ác. Lático e Piruvato estão agrupados por terem apresentados valores de DO_{600} intermediários. Já Acetato e Succinato apresentaram os menores valores, não tendo alcançado a DO_{600} de 0,7 mesmo após 24h de incubação.

Tabela 4: Valores de DO₆₀₀ obtidos após 24h de experimento e da taxa intrínseca de crescimento da bactéria *Escherichia coli* 30 nos diferentes meios avaliados.

Fonte de Carbono	DO ₆₀₀ média (24h)	μ
LB	2,52	1,475
Glicose	1.17	0.3737
Glicerol	1.19	0.357
Piruvato	0.96	0.3485
Succinato	0.54	0.2142
Ác. Lático	1.09	0.1943
Acetato	0.64	0.1763

A taxa intrínseca de crescimento não acompanhou os valores de DO₆₀₀, pois é calculada a partir da inclinação da reta. Dessa forma, as fontes que apresentaram um maior valor de μ tiveram um crescimento inicial rápido, porém com uma fase exponencial mais curta, se comparada ao LB, fazendo com que a fase estacionária tenha sido alcançada mais cedo. Isso causou uma desaceleração do crescimento e resultou no valor de DO₆₀₀ bem abaixo do que o que foi encontrado em meio LB.

2.4.2- Avaliação dos impactos dos parâmetros operacionais de cultivo na produção da progênie viral do bacteriófago vB_EcoM_UFV09

A partir das análises de regressão linear de superfície de resposta, feitas para cada um dos meios utilizados durante o estudo, foi possível determinar a equação que melhor sintetiza a influência dos parâmetros de cultivo (temperatura, tempo de incubação, agitação e MOI) sobre o número de partículas virais (Y) (variável resposta), e como esses fatores se relacionaram entre si ao final dos 28 ensaios realizados (ver Tabela 4). O resultado obtido a partir das titulações, em UFP/mL, foi logaritimizado para que as análises estatísticas fossem realizadas.

Tabela 5: Equações dadas a partir de análises de regressão linear de superfície de respostas e os respectivos valores de R². As fontes estão ordenadas de acordo com o número de carbonos que cada um possui, do menor para o maior. Te = temperatura; Ti = tempo de incubação; Rt = agitação e MOI = Multiplicity of Infection. Os dados foram obtidos com P-valor <0,05. Os números que apresentam * tiveram valores dentro do intervalo de significância.

Fonte	Equação	R ² (%)
Acetato	$-13,5 + 1,412*Te - 0,02214*Te^2$	39,87
Ácido Lático	9,6697	-
Piruvato	9,33	-
Glicerol	$8,908 + 85,7MOI - 809*MOI^2$	32,5
Succinato	$15,74 + 0,690Ti + 0,1070*Ti + 0,1326Rt + 57,7MOI - 599*MOI^2 - 0,003828*TeAg$	60,46
Glicose	$6,88 + 0,0597*Te + 0,00395*Ag + 262,1MOI - 490*MOI^2 - 1,205*AgMOI$	42,4
LB	$1,47 + 0,0955*Te + 1,098*Ti - 0,0593*Ti^2$	49,90

O valor de R^2 indica quanto dos resultados observados foram explicados pelas variáveis analisadas. Os meios M9 contendo ácido lático e piruvato não foram influenciados por nenhuma dessas variáveis, sendo assim, é fornecido apenas o valor da média dos resultados obtidos. Já o meio contendo succinato foi influenciado por todas as variáveis de cultivo analisadas.

Em geral, temperatura foi a variável que mais influenciou a produção de partículas virais, sendo significativa em 4 das 7 fontes de carbono avaliadas. Em seguida, temos o preditor MOI, que se manteve em 3 das 7 fontes. Tempo de incubação e Agitação foram representativos em apenas 2 das 7 fontes. A tabela 5 sintetiza os parâmetros que agiram de forma significativa em cada uma das fontes utilizadas durante a dinâmicas de infecção virais.

Tabela 6: Variáveis que influenciaram na produção da progênie viral (Y) nos diferentes meios de cultura utilizados. “X” indica que a variável influenciou na resposta; “-” indica que a variável não foi significativa.

Fonte de carbono	Temperatura (Te)	Tempo de incubação (Ti)	Agitação (Ag)	Multiplicity of infection (MOI)
Acetato	X	-	-	-
Ác. Lático	-	-	-	-
Piruvato	-	-	-	-
Glicerol	-	-	-	X
Succinato	X	X	X	X
Glicose	X	-	X	X
LB	X	X	-	-

2.4.2.1- Meio M9/acetato

A equação que sintetiza a influência das variáveis no número de partículas virais produzidas no meio M9/acetato é a seguinte: $Y_1 = -13,5 + 1,412*Te - 0,02214*Te^2$. Observe-se que a temperatura foi a única variável a interferir na resposta. A presença do termo quadrático na equação possibilita que o ponto ótimo dessa variável seja calculado, a partir do cálculo da seguinte derivada:

$$\frac{\delta Y_1}{\delta Te^2} = 2 * (-0,02214)Te + 1,412 = 31,9$$

Com isso, observamos que a temperatura ótima de produção em meio M9/acetato é de 31,9 °C (Figura 2).

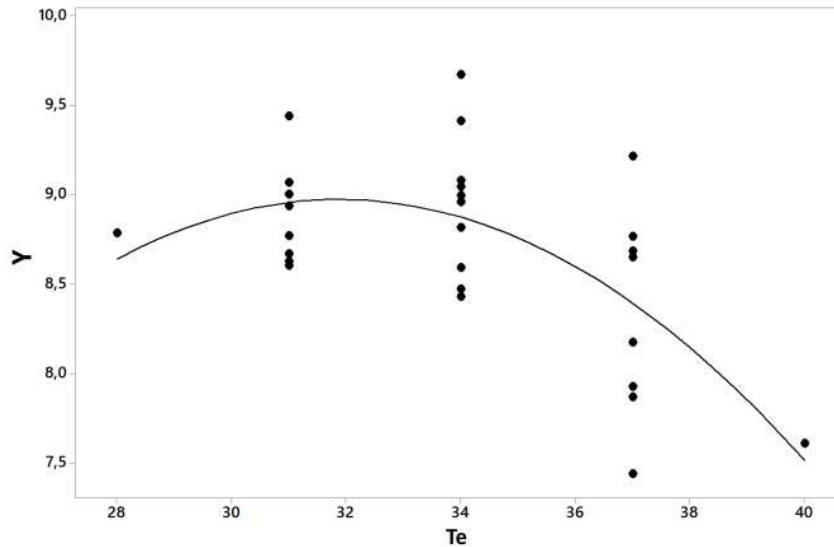


Figura 2: Gráfico de dispersão exibindo a correlação entre o número de partículas virais produzidas e temperatura.

2.4.2.2- Meio M9/ácido lático e Meio M9/Piruvato

Os ensaios realizados em meio M9/ác. lático e M9/piruvato não foram influenciados de forma significativa por nenhuma das variáveis avaliadas. Dessa forma, não foi possível determinar as melhores condições de cultivo sob tais meios.

2.4.2.3- Meio M9/glicerol

A influência das variáveis de cultivo nos ensaios realizados no meio M9/glicerol pode ser sintetizada pela seguinte equação: $Y_4 = 8,908 + 85,7MOI - 809*MOI^2$. A partir dela nota-se que o MOI foi a única variável que influenciou a produção da progênie viral. Semelhante ao que foi encontrado no meio M9/ acetato, a equação também apresentou um termo quadrático. A resolução da derivada a seguir permitiu determinar que o MOI ideal em meio M9/glicerol é igual a 0,052 (Figura 3).

$$\frac{\delta Y_4}{\delta MOI^2} = 2 * (-809)MOI + 85,7 = 0,052$$

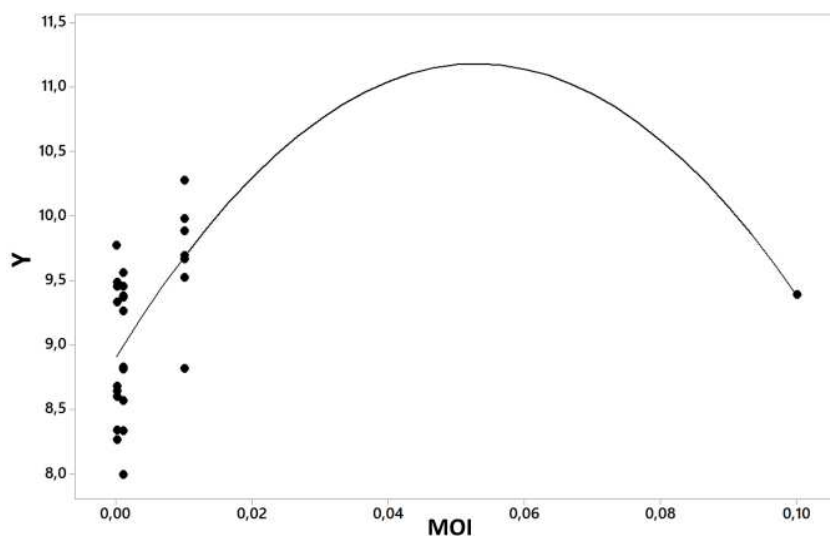


Figura 3: Gráfico de dispersão exibindo a correlação entre o número de fagos recuperados ao final dos ensaios e o MOI.

2.4.2.4- Meio M9/Succinato

Diferente de todas as demais fontes de carbono, o meio M9/succinato foi o único a sofrer influência de todas as variáveis de cultivo investigadas. A equação que exhibe essas relações é a seguinte: $Y_5 = 15,74 + 0,690Te + 0,1070 \cdot Ti + 0,1326Ag + 57,7MOI - 599 \cdot MOI^2 - 0,003828 \cdot TeAg$. A partir da interpretação dessas correlações é possível afirmar que a temperatura (Te) apresentou uma relação antagônica com a agitação (Ag). O valor positivo da variável tempo de incubação (Ti) indica que, quanto maior o tempo de incubação, melhor a resposta de Y, porém, sem a forma quadrática dessa variável não foi possível determinar o tempo ótimo de incubação. No que diz respeito ao MOI, o valor ótimo foi de 0,0482. A resolução da derivada encontra-se a seguir:

$$\frac{\delta Y_5}{\delta MOI} = 2 \cdot (-599)MOI + 57,7 = 0,0482$$

A Figura 4 exhibe os gráficos de superfície de resposta obtidos a partir das correlações apresentadas entre as variáveis e seu impacto na produção de partículas virais. Como 4 variáveis são analisadas, os gráficos foram plotados de forma que 2 variáveis são expostas e duas são omitidas e fixadas em seus valores ótimos, todas em função de Y.

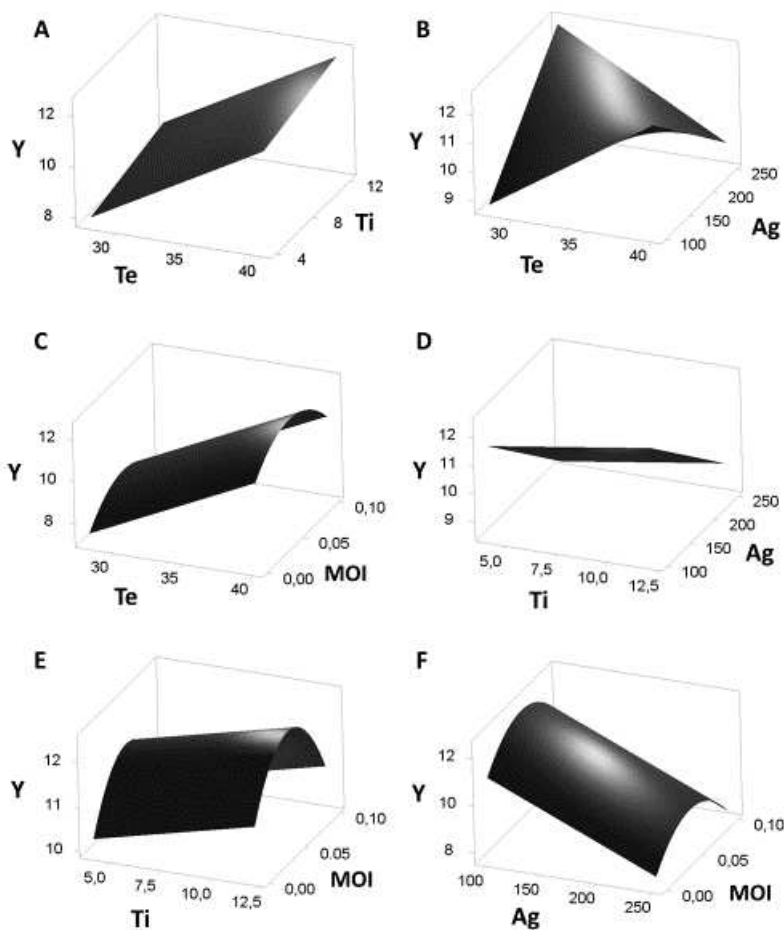


Figura 4: Gráficos de superfície de resposta obtidos a partir da equação $Y = 15,74 + 0,690Te + 0,1070 \cdot Ti + 0,1326Rt + 57,7MOI - 599 \cdot MOI^2 - 0,003828 \cdot Te \cdot Rt$, em meio mínimo M9/succinato. **A)** relação entre temperatura (Te) e tempo de incubação (Ti); **B)** relação entre temperatura (Te) e agitação (Ag); **C)** relação entre Temperatura (Te) e MOI; **D)** relação entre Tempo de incubação (Ti) e agitação (Ag); **E)** relação entre tempo de incubação (Ti) e MOI; e **F)** relação entre agitação (Rt) e MOI.

2.4.2.5- Meio M9/Glicose

A equação que sintetiza as relações que influenciaram os experimentos no meio M9/glicose é: $Y_6 = 6,88 + 0,0597 \cdot Te + 0,00395 \cdot Ag + 262,1MOI - 490 \cdot MOI^2 - 1,205 \cdot Ag \cdot MOI$. A ausência do termo “Ti”, indica que o tempo de incubação não influenciou nos resultados obtidos. A análise das variáveis temperatura (Te) e agitação (Ag) foram muito importantes nesse caso, pois ambas apresentaram valor positivo e significativo, o que indica relação positiva com a variável resposta Y. Isso se manteve para a temperatura, porém a agitação apresentou interação negativa com o MOI, o que denota ação antagônica. Na Figura 5A, observamos que, quanto maior a agitação, menor a produção de partículas virais. Foi possível calcular o MOI ótimo do processo de produção a partir da resolução da seguinte derivada:

$$\frac{\delta Y_6}{\delta MOI_2} = 2 * (-490)MOI + 262,2 - 1,205Rt = 0,144$$

A presença da variável agitação (Ag) nessa equação é proveniente da interação significativa que persistiu entre essas duas variáveis. O valor de Ag foi substituído por 100 (valor mínimo de agitação utilizada nos experimentos, mas que apresentou os melhores resultados) e o valor ótimo de MOI em M9/glicose foi de 0,144. Esse número foi levemente maior do que a quantidade máxima de MOI utilizada durante os ensaios.

A Figura 5 apresenta os gráficos de superfície de resposta das interações que aconteceram entre as variáveis no meio M9/glicose.

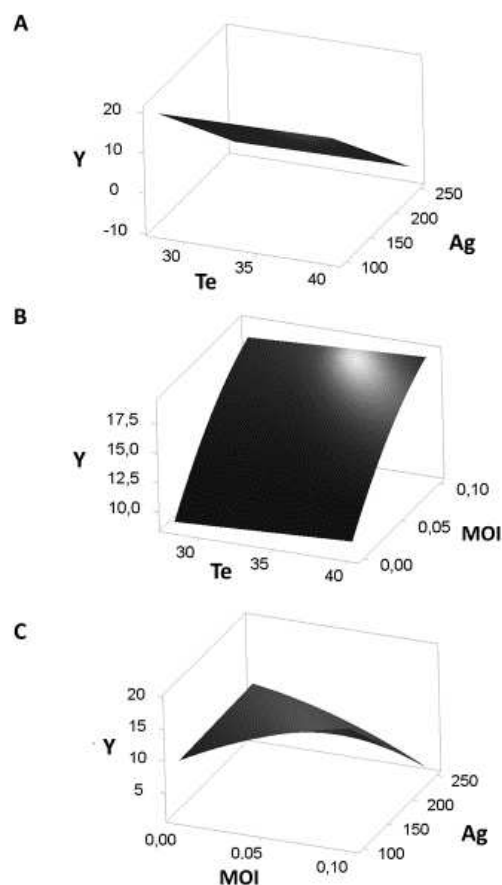


Figura 5: Gráficos de superfície de resposta obtidos a partir da equação $Y = 6,88 + 0,0597*Te + 0,00395*Rt + 262,1MOI - 490*MOI^2 - 1,205*RtMOI$, em meio mínimo M9/glicose. **A)** relação entre temperatura (Te) e agitação (Rt); **B)** Temperatura (Te) e MOI; e **C)** Agitação (Ag) e MOI.

2.4.2.6- Meio LB

No meio LB, as únicas variáveis que influenciaram a produção de partículas virais foram temperatura e tempo de incubação. A equação que sintetiza essa influência é a seguinte: $Y_7 = 1,47 + 0,0955*Te + 1,098*Ti - 0,0593*Ti^2$. A análise dessa equação mostra que a

temperatura também teve ação positiva sobre a produção de partículas virais, e que seus valores mais altos desencadearam melhor resposta de Y. A resolução da derivada abaixo permitiu a predição dos valores ideais de tempo de incubação:

$$\frac{\delta Y}{\delta MOI2} = 2 * (-0,0593)Ti + 1,098 = 9,25$$

Sendo assim, demonstrou-se que o tempo ótimo de incubação é de 9 horas e 15 minutos. A figura 6 apresenta o gráfico de superfície de resposta relacionando o tempo de incubação e a temperatura.

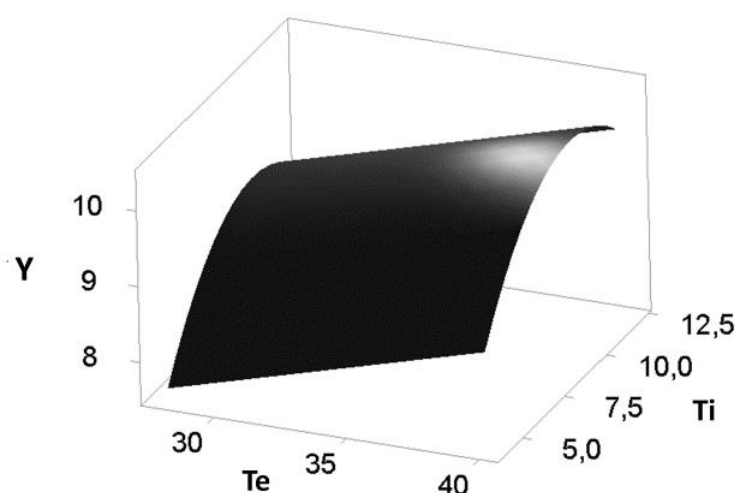


Figura 6: Gráfico de superfície de resposta obtidos a partir da equação $Y = 1,47 + 0,0955*Te + 1,098*Ti - 0,0593*Ti^2$, em meio rico LB. Relacionam-se as variáveis temperatura e tempo de incubação.

2.4.3- Predição da produção de partículas virais nos diferentes meios de cultivo.

A partir da averiguação de como as variáveis de cultivo se comportaram em cada um dos diferentes meios e dos pontos ótimos identificados, foi possível predizer o potencial de produção a ser alcançado em cada uma das condições estudadas.

Quanto menor a participação das variáveis temperatura, tempo de incubação, agitação e MOI nos meios de cultivo avaliados, mais essa predição foi baseada nos valores observados dos ensaios determinados por DCCR. A tabela 6 apresenta a faixa de produção da progênie viral, que tem o potencial matemático de ser alcançada se os valores ótimos determinados pelos resultados anteriores forem utilizados. Valores que se sobrepõem apresentam as mesmas letras sobrescritas e são estatisticamente semelhantes.

Tabela 7: predição dos valores que podem vir a ser alcançados utilizando-se das melhores condições de cultivo em cada um dos meios utilizados. Essa predição se baseia nas correlações apresentadas pelos parâmetros de cultivo e pela determinação de seus valores ótimos. O intervalo de confiança utilizado foi de 90%, ou seja P-valor <0,1.

Fonte	Limite inferior	Média de Y	Limite Superior
Acetato ^a	8,79	8,97	9,152
Piruvato ^{ab}	9,079	9,33	9,58
Ácido Lático ^b	9,17	9,66	9,74
Glicerol ^c	9,85	11,17	12,49
LB ^c	9,98	10,378	10,759
Succinato ^d	11,021	12,4709	13,71
Glicose ^d	12,728	18,92	25,11

2.5- Discussão

Metodologias que visam melhorar o processo de propagação de bacteriófagos invariavelmente deverão considerar a fisiologia do hospedeiro, e sua plasticidade genômica para responder aos estímulos ambientais que serão empregados durante os ensaios (BRYAN *et al.*, 2016). A bactéria *Escherichia coli* possui uma grande capacidade metabólica. Ela é capaz de produzir todos os precursores essenciais para as suas vias anabólicas, vitaminas e coenzimas reduzidas mesmo crescendo em baixas condições nutricionais, como é o caso do meio mínimo M9 (WHITE *et al.*, 2011).

O meio LB é um meio rico e complexo, pois possui em sua composição componentes provenientes de outros seres vivos, como o extrato da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (SEZONOV; ARI, 2007). A utilização do meio LB na propagação de fagos do gênero T4, tal como o vB_EcoM_UFV09 é muito comum, uma vez que seu hospedeiro (normalmente *E. coli*) apresenta um ótimo crescimento nesse meio, com o tempo de geração de 20 minutos na fase exponencial de crescimento (MILLER *et al.*, 2003; SEZONOV; ARI, 2007). Entretanto, apesar das vantagens de crescimento nesse meio, se a propagação viral em larga escala fosse feita em meio LB, os custos seriam altíssimos (Tabela 1).

Li *et al.*, 2014 comparou o metabolismo da estirpe bacteriana *Escherichia coli* BL21 em meio mínimo com glicose e em meio LB. Glicose é normalmente utilizada como fonte de carbono nesses estudos, por ter sua utilização preferencial e possuir 6 carbonos em sua composição. Dessa forma, ela entra na via glicolítica e promove o melhor aproveitamento energético possível na célula (WHITE *et al.*, 2011). Em meio rico (LB), a maioria dos genes que codificam precursores importantes na célula, como determinados aminoácidos, estão em níveis basais, ou até mesmo reprimidos, uma vez que esses precursores já estão presentes no meio de crescimento. Sendo assim, a maquinaria celular é direcionada para a produção de macromoléculas, o que acelera seu crescimento (LI *et al.*, 2014). Por outro lado, muitos genes estão ativos durante o crescimento em meio mínimo, principalmente os que codificam as enzimas da fase inicial da glicólise e de todo ciclo do ácido cítrico, além dos da biossíntese de aminoácidos. Em meio mínimo, 20% da massa relativa de proteínas da célula correspondem à enzimas envolvidas na síntese de aminoácidos, contra 6% em meio rico. Além disso, as enzimas do sistema PTS (Phospho-transferase system) também estão em maior quantidade em meio mínimo. Esse é um dos sistemas de transporte de carboidratos mais importante da célula, principalmente em meios contendo a glicose como fonte de carbono (LI *et al.*, 2014).

Esses dados apontam que em meio rico há abundância de moléculas importantes para o crescimento celular, e que há sobra energética na célula que cresce nesse meio. Essa energia é convertida em crescimento celular, uma vez que ela não precisa ser deslocada para a síntese de compostos que já se encontram no meio. Já em uma célula que cresce em meio mínimo contendo glicose, mais da demanda energética celular é direcionada para o anabolismo (uma vez que várias vias metabólicas se tornam ativas pela baixa concentração de metabólitos do meio), fazendo com que a energia gerada seja aplicada na biossíntese de precursores.

Além de glicose e LB, no presente trabalho utilizamos fontes de carbono consideradas gliconeogênicas (acetato, ácido láctico, piruvato, glicerol e succinato). As fontes de carbono gliconeogênicas são aquelas que não passam pela via glicolítica ao entrar na célula, o que acarreta uma menor produção de energia (uma vez que a via glicolítica produz 2 ATPs por molécula de glicose) (WHITE, 2011). Além disso, é necessário que uma porcentagem dos carbonos provenientes dessas fontes sigam o caminho da gliconeogênese, uma via que consome ATPs, mas exceto por pequenos desvios, refaz o caminho da glicólise para que precursores celulares importantes possam ser formados. O local de entrada de cada uma das fontes utilizadas nesse estudo e o caminho que elas percorrem pela célula é esquematizado na figura 7.

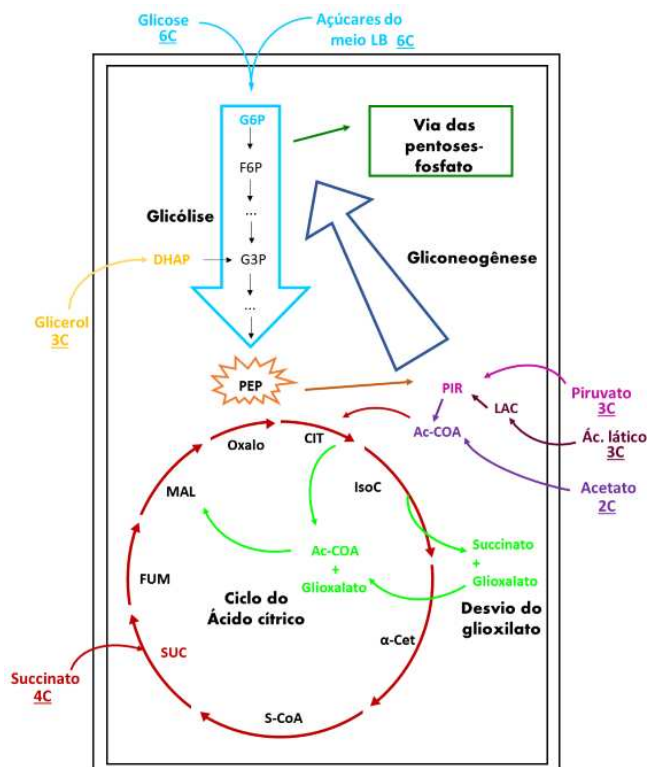


Figura 7: desenho esquemático sobre como as vias metabólicas e as fontes de carbono utilizadas nesse estudo se relacionam. Estão omitidas as enzimas que catalisam as reações, diversas reações que não estão relacionadas diretamente ao metabolismo dessas fontes, e as reações de produção e consumo de coenzimas reduzidas. Legenda: G6P = glicose-6-fosfato; F6P = frutose-6-fosfato; G3P = gliceraldeído-3-fosfato; DHAP = dihidroxiacetona-fosfato; PEP = Fosfoenolpiruvato; PIR = Piruvato; LAC = Ác. láctico; Ac-CoA = Acetil-CoA; CIT = citrato; Iso-C = Isocitrato; α -Cet = Alfa-cetogluturato; S-Coa = Succini-CoA; SUC = Succinato; FUM = fumarato; MAL= malato; Oxalo=Oxaloacetato

Muitos trabalhos que envolvem o cultivo de micro-organismos sugerem que, quanto mais carbonos uma fonte possui, melhor será o crescimento bacteriano, e conseqüentemente, melhor a produção de uma progênie viral em caso de infecção (PALIY; GUNASEKERA, 2007a; THAKUR *et al.*, 2010). No entanto, tal suposição se aplicou de forma parcial no nosso estudo.

Os valores da curva crescimento da bactéria *Escherichia coli* 30 nos diferentes meios avaliados demonstraram que o meio LB realmente é o meio no qual a bactéria alcança um maior número de células, pois foi o que obteve a maior leitura em DO₆₀₀ após 24 horas de incubação. Os nossos resultados corroboraram com estudos anteriores e demonstraram o mesmo perfil de crescimento, tendo o meio M9/succinato como o que obteve o pior valor de DO₆₀₀ (PALIY; GUNASEKERA, 2007b; THAKUR *et al.*, 2010). Porém, se levarmos em conta o valor da taxa intrínseca de crescimento (μ), embora LB e o meio M9/glicose tenham apresentado crescimento mais rápido, eles foram seguidos por glicerol e piruvato, que possuem 3 carbonos em sua composição. Apesar desses dados serem informativos, eles ainda não nos permitem tirar grandes conclusões sobre como esse comportamento reflete no processo de produção viral.

Embora a composição do meio de cultura em si já possua um grande potencial de afetar a produção de partículas virais, nós também avaliamos o impacto de outros parâmetros operacionais (temperatura, tempo de incubação, agitação e MOI) sobre tal produção. Warner *et al.*, em 2014 realizou um estudo que avaliava o impacto de diversos parâmetros de cultivo para a produção em larga escala do fago filamentosso M13. Eles observaram que a composição do meio de cultura teve o maior efeito sobre a progênie viral, seguida pela temperatura. Porém, contrariando o que encontramos no presente estudo, no caso do fago M13, quanto maior a temperatura, melhor o crescimento bacteriano e pior a produção de partículas virais (WARNER *et al.*, 2014).

Em geral, observamos que cada meio de cultivo foi influenciado de forma distinta pelas variáveis analisadas. Temperaturas mais altas potencializaram a produção da progênie viral, exceto no meio M9/acetato, que teve sua temperatura ótima por volta dos 32 °C. A

agitação pouco influenciou nos resultados, e quando se mostrou significativa nos meios M9/succinato e M9/glicose, foi seu valor mínimo (100rpm) que apresentou o melhor desempenho, sugerindo que não há a necessidade de agitação intensa para que uma boa produção seja alcançada. Tempo de incubação também influenciou apenas os meios M9/glicose e LB. Quando uma variável não apresenta influência significativa sobre uma condição de cultivo, assumimos que, independente do valor utilizado, a resposta será a mesma. No caso do tempo de incubação, esse resultado pode ser interpretado como positivo. Se a produção viral foi semelhante tanto no menor tempo de cultivo quanto no maior tempo de cultivo, presumimos que não há a necessidade de grandes períodos de incubação, o que otimiza a produção em larga escala. A proporção de fagos com relação ao número de bactérias hospedeiras (MOI) foi significativo nos meios M9/glicerol, M9/succinato e M9/glicose. A presença do termo quadrático de MOI nessas equações permitiu que o valor ótimo do inóculo nesses três meios fosse encontrado. O número de partículas virais inoculadas ao longo dos 28 ensaios realizados variou de aproximadamente $1,2 \times 10^3$ (quando o MOI 0,00001 foi utilizado) até $1,2 \times 10^7$ (quando o MOI foi de 0,1). Em M9/glicerol e M9/succinato o valor ótimo de MOI foi semelhante, e ficou por volta de $6,0 \times 10^5$. No meio M9/glicose, o valor previsto superou o valor máximo utilizado durante os experimentos, e foi de $1,7 \times 10^7$.

A determinação dos valores ótimos de alguns parâmetros de cultivo e a determinação de sua influência (negativa ou positiva) sobre a variável resposta, possibilitou que uma predição sobre a produção fosse realizada. Predições como essas se baseiam em modelos matemáticos, e esses valores podem ou não ser alcançados na prática. A predição da capacidade de produção de partículas virais no meio M9/glicose, a partir das melhores condições de cultivo encontradas, apresentou valores curiosamente altos. Embora os valores tenham sido dados em log, um cálculo simples permite o entendimento de que o modelo sugere ser possível produzir um número de fagos que alcance a casa de 10^{25} . Na prática, esses valores são praticamente inalcançáveis.

Apesar da influência dos parâmetros de produção terem sido interpretados para cada meio de cultivo, o valor de R^2 das equações utilizadas pode despertar certo receio, uma vez que são relativamente baixos, e no caso de M9/piruvato e M9/ác. láctico, nem puderam ser determinados. Quanto mais próximo de 100 são os valores de R^2 , maior será a porcentagem da variação observada na variável resposta explicada pelas variáveis preditoras utilizadas, e menos por fatores estocásticos. Com isso, temos que, no meio M9/succinato, 60,5% dos

valores obtidos foram influenciados pelos parâmetros de produção, e em M9/ác. láctico e M9/piruvato esses parâmetros não influenciaram na resposta obtida. Embora esses resultados não pareçam animadores a princípio, eles levantam o seguinte questionamento: se os valores dos parâmetros de cultivo aqui empregados foram baseados em valores descritos na literatura, como pode ser possível que eles não tenham influenciado em nada, ou muito pouco, na produção de partículas virais?

Ao avaliarmos as equações obtidas a partir do DCCR (tabela 4), e a predição dos valores que podem vir a ser alcançados utilizando-se das melhores condições de cultivo por fonte de carbono (tabela 6), percebemos a presença de um padrão. Os menores valores de R^2 e os menores valores de produção preditos pertencem aos meios cujo as fontes de carbono possuem 2 ou 3 carbonos (acetato, ácido láctico, piruvato e glicerol). Considerando ainda que uma molécula de piruvato e de lactato são extremamente semelhantes, e que os parâmetros de cultivo se comportaram da mesma forma nesses meios, presumimos que, mais do que os parâmetros de cultivo, a composição da fonte de carbono foi determinante para o resultado obtido.

Os bacteriófagos do tipo T4-like interrompem toda a atividade celular quando iniciam o processo de infecção viral. A maquinaria do hospedeiro é redirecionada para atender as demandas virais, como a produção das proteínas estruturais e a replicação do genoma do fago. Enquanto isso o genoma do hospedeiro é lentamente degradado (MILLER *et al.*, 2003). No caso do fago vB_EcoM_UFV09, o tempo entre o início da infecção até a lise celular acarretada pela liberação da progênie formada é de 40 minutos. Dessa forma, acreditamos que o estado fisiológico da célula antes do processo de infecção se iniciar, irá determinar o tamanho da progênie formada, assim como já reportado em alguns estudos (CHOI *et al.*, 2010; HADAS *et al.*, 1997).

No ambiente, as demandas de uma célula bacteriana são: sobrevivência, manutenção e, se houver energia suficiente, crescimento. Acreditamos que as células que crescem nos meios com fontes de 2 ou 3 carbonos já trabalhavam num estado metabólico sobrecarregado, produzindo o máximo de energia e o máximo de precursores possível a partir da fonte de carbono. Sendo assim, mesmo com o aumento da temperatura, da agitação ou dos estímulos previstos pelo DCCR, não seria possível melhorar o desempenho delas em produzir partículas virais.

As fontes de carbono analisadas no presente estudo não necessariamente tiveram um desempenho ruim, embora acetato tenha apresentado os menores valores de produção. Na verdade, elas tiveram um comportamento instável durante os ensaios, apresentando altas e baixas progênies em momentos distintos. Sugerimos que essa instabilidade na produção não teve correlação com as variáveis de cultivo e sim com aspectos fisiológicos do hospedeiro. Por fim, a ideia de que quanto mais carbonos uma fonte possui, melhor será o crescimento bacteriano e conseqüentemente, melhor a produção viral, se aplicou de forma parcial no nosso estudo. Isso porque ela não foi verdadeira quando o crescimento bacteriano foi avaliado de forma isolada. Nesse contexto, apesar de glicerol e piruvato terem apresentado o segundo e o terceiro maior valor de μ respectivamente, eles não obtiveram um bom desempenho na produção de partículas virais. Sendo assim, o valor de μ não é um bom parâmetro para se correlacionar com a produção viral. Embora o meio LB apresente um μ muito maior do que o encontrado nos meios mínimos, a produção viral foi semelhante à encontrada em meio M9/glicose.

2.6- Conclusão

As análises demonstraram que os parâmetros de cultivo influenciaram os meios de cultura de forma distinta. Acreditamos que, em alguns casos, como nos meios M9/acetato, M9/ác. láctico, M9/piruvato e M9/glicerol, o crescimento microbiano exigia tanto de sua capacidade metabólica, que as alterações externas não conseguiam influenciar no desempenho da produção viral, tornando impossível prever as melhores condições de cultivo e estimar um potencial de produção a partir delas. Dessa forma, levando em conta fatores como: viabilidade econômica, confiabilidade de produção e estabilidade fisiológica, encontramos que o meio M9/glicose apresentou o melhor desempenho na propagação do vB_EcoM_UFV09.

2.7- Referências

BARTON, Larry L.; HAMILTON, W. Allan (Ed.). Sulphate-reducing bacteria: environmental and engineered systems. **Cambridge University Press**, 2007.

BELGINI, D. R. B. et al. Culturable bacterial diversity from a feed water of a reverse osmosis system, evaluation of biofilm formation and biocontrol using phages. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 10, p. 2689-2700, 2014.

BRYAN, Daniel *et al.* Bacteriophage T4 Infection of Stationary Phase *E. coli*: Life after Log from a Phage Perspective. **Frontiers in Microbiology** v. 7, n. September, p. 1–12, 2016.

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

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

CHOI, Charles *et al.* The Effect of Cell Size on the Burst Size of T4 Bacteriophage Infections of *Escherichia coli* B23. **Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)** v. 14, n. April, p. 85–91, 2010.

CURBELO, Fabíola D. S. Recuperação avançada de petróleo utilizando tensoativos. **Doutorado, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte**, Natal-RN, 2006.

DUARTE, Vinícius *et al.* A T4virus prevents biofilm formation by *Trueperella pyogenes*. **Veterinary Microbiology** v. 218, n. October 2017, p. 45–51, 2018.

DUARTE, Vinícius *et al.* Complete Genome Sequence of vB_{EcoM}-UFV13, a New Bacteriophage Able To Disrupt *Trueperella pyogenes* Biofilm. v. 4, n. 6, p. 4–5, 2016.

ENDERSEN, Lorraine et al. Phage therapy in the food industry. **Annual review of food science and technology**, v. 5, p. 327-349, 2014.

FRAISE, A. P. Biocide abuse and antimicrobial resistance—a cause for concern?. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 11-12, 2002.

FRUCIANO, 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.

GIEG, Lisa M.; JACK, Tom R.; FOGHT, Julia M. Biological souring and mitigation in oil reservoirs. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 92, n. 2, p. 263, 2011.

GOLKAR, Zhabiz; BAGASRA, Omar; PACE, Donald. Bacteriophage therapy: A potential solution for the antibiotic resistance crisis. **Journal of Infection in Developing Countries** v. 8, n. 2, p. 129–136, 2014.

GRABOWSKI, Agnès et al. Microbial diversity in production waters of a low-temperature biodegraded oil reservoir. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 54, n. 3, p. 427-443, 2005.

HADAS, Hilla; EINAV, Monica; ZARITSKY, Arieh. Bacteriophage T4 development

depends on the physiology of its host *Escherichia coli*. **Microbiology** v. 143, p. 179–185 , 1997.

KEEN, Eric C. Phage therapy : concept to cure. **Frontiers in Microbiology** v. 3, n. July, p. 1–3 , 2012.

KROPINSKI, Andrew M. et al. Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. **In: Bacteriophages**. Humana Press, 2009. p. 69-76.

LI, Zhaopeng; NIMTZ, Manfred; RINAS, Ursula. The metabolic potential of *Escherichia coli* BL21 in defined and rich medium. p. 1–17 , 2014.

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.

MILLER *et al.* Bacteriophage T4 Genome. **American Society for Microbiology** v. 67, n. 1, p. 86–156 , 2003.

PALIY, Oleg; GUNASEKERA, Thusitha S. Growth of *E. coli* BL21 in minimal media with different gluconeogenic carbon sources and salt contents. **Applied Microbiology and Biotechnology** p. 1169–1172 , 2007.

RABUS, Ralf et al. A post-genomic view of the ecophysiology, catabolism and biotechnological relevance of sulphate-reducing prokaryotes. **In: Advances in microbial physiology**. Academic Press, 2015. p. 55-321

SEZONOV, Guennadi; ARI, Richard D. *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. **Journal of Bacteriology** v. 189, n. 23, p. 8746–8749 , 2007.

SKURNIK, Mikael; STRAUCH, Eckhard. Phage therapy: Facts and fiction. **International Journal of Medical Microbiology** v. 296, p. 5–14 , 2006.

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

THAKUR, Chandar S *et al.* Growth of wildtype and mutant *E. coli* strains in minimal media for optimal production of nucleic acids for preparing labeled nucleotides. p. 771–779 , 2010.

WARNER, Christopher M. et al. M13 bacteriophage production for large-scale applications. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 37, n. 10, p. 2067-2072, 2014.

WHITE, A. P. et al. Intergenic sequence comparison of *Escherichia coli* isolates reveals lifestyle adaptations but not host specificity. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 77, n. 21, p. 7620-7632, 2011.

WRIGHT, A *et al.* A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. **Clinical Otolaryngology** p. 349–357 , 2009.

2.8.1- Anexo 1 – Delineamento experimental

Tabela com os ensaios do Delineamento de Composto Central Rotacional (DCCR) realizados para a determinação das melhores condições de cultivo.

Ensaio	Te (°C)	Ti (h)	Ag (rpm)	MOI
1	31	6	138	0.01
2	37	6	138	0.01
3	31	10	138	0.01
4	37	10	138	0.01
5	31	6	215	0.01
6	37	6	215	0.01
7	31	10	215	0.01
8	37	10	215	0.01
9	31	6	138	0.0001
10	37	6	138	0.0001
11	31	10	138	0.0001
12	37	10	138	0.0001
13	31	6	215	0.0001
14	37	6	215	0.0001
15	31	10	215	0.0001
16	37	10	215	0.0001
17	28	8	175	0.001
18	40	8	175	0.001
19	34	4	175	0.001
20	34	12	175	0.001
21	34	8	100	0.001
22	34	8	250	0.001
23	34	8	175	0.10
24	34	8	175	0.00001
25	34	8	175	0.001
26	34	8	175	0.001
27	34	8	175	0.001
28	34	8	175	0.001

2.8.2- Anexo 2 – Meios e Tampões utilizados

Tampão SM – 1L

Reagente	Quantidade
NaCl	5,8 g
MgSO ₄	2 g
Tris.HCl	6 g
Gelatina	1 g
H ₂ O destilada	Completar o volume

* Ajustar pH para 7

Sais M9 – 5X – 1L

Reagente	Quantidade
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	6 g
KH ₂ PO ₄	15 g
NaCl	2,5 g
NH ₄ Cl	5 g
H ₂ O destilada	Completar o volume

Meio M9 – 1L

Reagente	Quantidade
Sais M9	200 mL
MgSO ₄ (0,1M)	20 mL
CaCl ₂ (0,5 M)	200 µL
Fonte de Carbono	4 g
H ₂ O destilada	Completar o volume

Luria Bertani Broth (Meio LB) – 1L

Reagente	Quantidade
NaCl	10 g
Triptona	10g
Extrato de levedura	5 g

* Ajustar pH para 7
