

**ISABELA DA SILVA PAES**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE UM COQUETEL DE BACTERÍOFAGOS E UMA  
PEPTIDEOGLICANO-HIDROLASE ASSOCIADA A VIRION SOBRE BIOFILME DE  
BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO**

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*.

Orientador: Sérgio Oliveira de Paula

Coorientadores: Roberto Sousa Dias  
Bruna Almeida Leão Ayupe

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2021**

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

T

Paes, Isabela da Silva, 1996-

P126a  
2021  
Avaliação do efeito de um coquetel de bacteriófagos e uma peptidoglicano-hidrolase associada a virion sobre biofilme de bactérias redutoras de sulfato / Isabela da Silva Paes. – Viçosa, MG, 2021.

1 dissertação eletrônica (84 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Sérgio Oliveira de Paula.

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

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2021.198>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Bacteriófagos. 2. Biofilmes. 3. Bactéria redutora de sulfato. I. Paula, Sérgio Oliveira de, 1976-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 579.26

Bibliotecário(a) responsável: Renata de Fátima Alves CRB6/2578

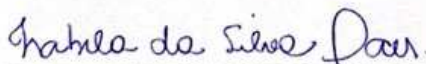
ISABELA DA SILVA PAES

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE UM COQUETEL DE BACTERÍOFAGOS E UMA  
PEPTIDEOGLICANO-HIDROLASE ASSOCIADA A VIRION SOBRE BIOFILME DE  
BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO**

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: 12 de julho de 2021.

Assentimento:



---

Isabela da Silva Paes  
Autora



---

Sérgio Oliveira de Paula  
Orientador

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela proteção diária e por me proporcionar oportunidades incríveis.

Aos meus pais, Maria da Conceição e Braz, por todo apoio e carinho, por confiarem em mim e nas minhas escolhas. A minha irmã Gabriela, por todo companheirismo e amparo.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

À todos os meus amigos do Laboratório de Imunovirologia Molecular (LIVM), foi um prazer trabalhar com uma equipe tão maravilhosa.

Ao meu orientador, professor Sérgio Oliveira de Paula, pela oportunidade de estágio lá em 2016, durante minha graduação, e depois em 2019 como mestranda.

À Petrobras pela concessão da bolsa de estudos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao Vinícius da Silva Duarte por todos os ensinamentos, primeiros inclusive, você foi quem possibilitou minha chegada até aqui.

Ao Roberto Sousa Dias e Bruna Almeida Leão Ayupe, por me orientar durante toda a execução deste projeto e me amparar nos momentos mais difíceis.

As minhas amigas Marcella Silva Vieira e Adriele Jéssica do Carmo, que nesses dois anos e meio fizeram a lutas diárias mais leves e prazerosas, mesmo em pandemia.

A todos que de alguma forma fizeram parte da minha formação pessoal e acadêmica,

A minha gratidão.

*“Não basta conquistar a sabedoria, é preciso usá-la”*

(Cícero)

## RESUMO

PAES, Isabela da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2021. **Avaliação do efeito de um coquetel de bacteriófagos e uma peptidoglicano-hidrolase associada a virion sobre biofilme de bactérias redutoras de sulfato.** Orientador: Sérgio Oliveira de Paula. Coorientadores: Roberto Sousa Dias e Bruna Almeida Leão Ayupe.

O biofilme consiste em um dos grandes associados a indústria petrolífera, devido à dificuldade na remoção completa dos microrganismos inseridos na matriz. O biofilme formado por BRS é o responsável pelo aumento da concentração de metabólitos corrosivos no interior das instalações metálicas e diferentes abordagens são almejadas para mitigar este problema. Os bacteriófagos e suas proteínas líticas, como peptidoglicano-hidrolases associadas a vírions (VAPGH), têm se mostrado uma alternativa para eliminação de microrganismos devido à sua especificidade. No primeiro capítulo deste trabalho foi avaliado o potencial de um coquetel, composto por seis bacteriófagos, na prevenção da formação e remoção do biofilme de culturas mistas de bactérias redutoras de sulfato, isoladas da indústria petrolífera. Foi observado que o coquetel de bacteriófagos proposto preveniu parcialmente a formação do biofilme pela cultura P55(água de injeção] e P48SEP (separador de produção), e impediu a formação do mesmo para as culturas P48SEP, P55 e P37 (tange *Slop*). Ademais, no segundo capítulo foi avaliada a atividade muralítica de uma putativa VAPGH, codificada pelo bacteriófago vB\_EcoM-UFV13 e expressa de forma heteróloga, em um sistema procaríoto, sobre a formação de biofilme por *Escherichia coli*. A VAPGH 246 foi expressa a partir da indução com 0,5 mM IPTG e purificada por cromatografia de afinidade. Foi observada a redução significativa do biofilme de *E. coli* após 24h de tratamento. A presença da enzima, mesmo em baixas concentrações, mostrou ser mais efetivo que o tratamento com o bacteriófago vB\_EcoM-UFV13. Desse modo demonstrando o potencial biotecnológico da aplicação de coquetéis fágicos multiespecíficos, assim como potencial das VAPGHs na eliminação e prevenção da formação de biofilmes de diferentes microrganismos.

Palavras-chave: Bacteriófagos. VAPGH. Biofilme. Bactérias Redutoras de Sulfato

## ABSTRACT

PAES, Isabela da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2021. **Evaluation of the effect of a bacteriophage cocktail and a virus-associated peptidoglycan hydrolase on the biofilm of sulfate-reducing bacteria.** Adviser: Sérgio Oliveira de Paula. Co-advisers: Roberto Sousa Dias and Bruna Almeida Leão Ayupe.

Biofilm is one of the great ones associated with the oil industry, due to the difficulty of completely removing the microorganisms inserted in the matrix. The biofilm formed by BRS is responsible for the increase in the concentration of corrosive metabolites inside metallic installations and different approaches are aimed at mitigating this problem. Bacteriophages and their lytic proteins, such as peptidoglycan hydrolases associated with virions (VAPGH), are an alternative for eliminating microorganisms due to their specificity. In the first chapter of this work, the potential of a cocktail, composed of six bacteriophages, in preventing the formation and removal of biofilm of mixed cultures of sulfate-reducing bacteria, leaders in the oil industry, was evaluated. It was observed that the proposed bacteriophage cocktail partially prevented the formation of biofilm by the P55 (injection water) and P48SEP (production separator) cultures, and prevented the formation of the same for the P48SEP, P55 and P37 cultures (Slop tango). Furthermore, in the second chapter, the muralitic activity of a VAPGH putative, encoded by the bacteriophage vB\_EcoM-UFV13 and expressed heterologously, in a prokaryotic system, on biofilm formation by *Escherichia coli* was evaluated. VAPGH 246 was expressed from induction with 0.5 mM IPTG and purified by affinity chromatography. Was observed a decrease in the *E. coli* biofilm after 24h of treatment. The presence of the enzyme, even in low drops, is more effective than treatment with the bacteriophage vB\_EcoM-UFV13. Thus, demonstrating the biotechnological potential of the application of multispecific phage cocktails, as well as the potential of VAPGHs on biofilms of different microorganisms.

Keywords: Bacteriophages. VAPGH. Biofilm. Sulphate-reducing bacteria

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO 1

Figura 1 - Microscopia eletrônica de transmissão do bacteriófago vB\_Cfr-UFV1 (C1).....48

Figura 2 - Microscopia eletrônica de transmissão do bacteriófago vB\_Ecl-UFV1 (Ent).....48

Figura 3 - Ensaio de prevenção da formação do biofilme das culturas mistas de plataformas de petróleo na presença dos fagos isolado, coquetel de bacteriófagos e THPS utilizando método de cristal violeta 0,1 %. \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001; \*\*\*\*P<0,0001.....50

Figura 4 - Ensaio de remoção do biofilme das culturas mistas de plataformas de petróleo presença dos fagos isolado, coquetel de bacteriófagos e THPS utilizando método de cristal violeta 0,1%. \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001; \*\*\*\*P<0,0001.....52

### CAPÍTULO 2

Figura 1 - Representação esquemática do inserto no vetor de expressão pET24a+. Representação gráfica utilizado o software SnapGene®.....67

Figura 2 - Confirmação da transformação da E. coli BL21(DE3) com o plasmídeo codificando a enzima 246. MM: marcador molecular; 246: reação com o DNA plasmidial da bactéria transformada; E. coli BL21: reação com o DNA plasmidial da bactéria não transformada; B: branco da reação de PCR.....73

Figura 3 - Avaliação da expressão da VAPGH 246 por SDS-PAGE 10% corado com Coomassie® Azul brilhante. MM: marcador molecular, 1: fração solúvel 246 sem purificar, 2: fração solúvel 246 purificada por cromatografia de afinidade (His-tag). epresentação esquemática do inserto no vetor de expressão pET24a+.....74

Figura 4 - Confirmação da expressão da VAPGH por western blotting. MM: marcador molecular, 1: fração solúvel BL21 sem purificar, 2: fração solúvel BL21 purificada por cromatografia de afinidade (His-tag), 3: fração insolúvel BL21 purificada por cromatografia de afinidade (His-tag), 4: fração solúvel 246 sem purificar, 5: fração solúvel 246 purificada por cromatografia de afinidade (His-tag), 6: fração solúvel 246 purificada por cromatografia de afinidade (His-tag). (A) Western blotting coloração com Ponceau 1%, (B) Western blotting revelação com anticorpo anti-histidina. sentação esquemática do inserto no vetor de expressão pET24a+ .....75

Figura 5 - Ensaio de prevenção da formação do biofilme de Escherichia coli pela VAPGH 246 recombinante por 24 h em placas de 96 poços. O biofilme foi avaliado utilizando o método de cristal violeta 0,1%. \*\*P<0,01 .....76

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
APS	Adenosina Fosfosulfato
ATP	Adenosina Trifosfato
BRS	Bactérias Redutoras de Sulfato
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C1	vB_Cit-UFV1
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
C-MIC	<i>Chemistry MIC</i>
D.O	Densidade óptica
D.O <sub>600nm</sub>	Densidade óptica a 600 nm
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EcoRI	Endonulcease de restrição isolada de Escherichia coli
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
E-MIC	<i>Eletrogenic MIC</i>
ENT	vB_Ent-UFV1
EPS	<i>Extracellular Polymeric substance</i>
FeS	Sulfeto de Ferro
FeSO <sub>4</sub>	Sulfato de ferro II
g	Gramas

H <sub>2</sub>	Hidrogênio
H <sub>2</sub> S	Sulfeto de hidrogênio
kDa	Quilo Dalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato Monopotássico
L	Litro
LB	Meio de cultivo Luria Bertani
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnésio
MIC	<i>Microbiologically influenced corrosion</i>
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de sódio dissódico
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de sódio monosódico
NaOH	Hidróxido de sódio
NdeI	Endonuclease de restrição isolada de <i>Neisseria denitrificans</i>
Ng	Nanogramas
NH <sub>4</sub> Cl	Cloreto de amônio
Nm	nanômetro
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
pb	Pares de bases
PBS 1X	Tampão fosfato salina 1X
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>

pH	Potencial de hidrogênio
rpm	Rotações por minuto
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Sulfato
THPS	Sulfato de tetrakis hidróxido metil fosfônico
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UFP	Unidade formadora de placa
VAPGH	<i>Virion-Associated Peptidoglycan Hydrolases</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

% – Porcentagem

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>15</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>18</b>
2.1 Bactérias Redutoras de Sulfato.....	18
2.2 Corrosão Influenciada por Microrganismos.....	18
2.3 Biofilme .....	20
2.4 Controle dos microrganismos e do biofilme .....	22
2.5 Bacteriófagos .....	23
2.6 Peptideoglicano-hidrolases associadas a vírions .....	26
2.7 Referências.....	30
<b>3. CAPÍTULO 1: EFEITO DE UM COQUETEL DE BACTERIÓFAGOS NÃO-ESPECÍFICO SOBRE O BIOFILME DE CULTURAS MISTAS EM DIFERENTES CENÁRIOS PETROLÍFEROS</b>	
3.1 Introdução .....	40
3.2 Material e Métodos.....	42
3.2.1 Isolamento e propagação viral.....	42
3.2.2 Análise morfológica dos bacteriófagos .....	43
3.2.3 Culturas bacterianas e condições de cultivo .....	43
3.2.4 Formulação do coquetel de bacteriófagos .....	44
3.2.5 Ensaio de atividade sobre biofilme.....	45
3.2.6 Análise estatística .....	46
3.3 Resultados .....	47
3.3.1 Isolamento e caracterização morfológica dos bacteriófagos C1 e Ent ..	47
3.3.2 Ensaio de atividade sobre o biofilme.....	49
3.4 Discussão.....	54
3.5 Conclusões .....	59
3.6 Referências.....	60
<b>4. CAPÍTULO 2: ATIVIDADE DE UMA PEPTIDEOGLICANO-HIDROLASE ASSOCIADA A VIRION (VAPGH) RECOMBINANTE DO BACTERIÓFAGO vB_EcoM-UFV13 NO CONTROLE DA FORMAÇÃO DO BIOFILME</b>	

4.1 Introdução .....	65
4.2 Material e Métodos.....	67
4.2.1 Construção de vetores de expressão .....	67
4.2.2 Transformação em célula competente.....	67
4.2.3 Extração de DNA plasmidial .....	68
4.2.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	69
4.2.5 Expressão das proteínas recombinantes.....	69
4.2.6 Purificação da proteína .....	70
4.2.7 Avaliação da expressão da proteína recombinante .....	71
4.2.8 Western blotting.....	71
4.2.9 Atividade da enzima sobre a formação de biofilme .....	72
4.3 Resultados.....	73
4.3.1 Expressão da proteína recombinante .....	73
4.3.2 Atividade da enzima sobre a formação de biofilme .....	75
4.4 Discussão.....	77
4.5 Conclusões .....	80
4.6 Referências.....	81

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O petróleo constitui uma das principais fontes de energia no Brasil e no mundo. Em 2018, o Brasil se posicionava entre os dez maiores produtores de petróleo do mundo (ANP, 2019), entretanto, a produção anual ainda não garante a autossuficiência em petróleo. Diferentes abordagens tem sido aprimoradas durante a recuperação do petróleo para aumentar a produção e manter a qualidade do óleo, como por exemplo, a injeção de água do mar, polímeros, surfactantes, gases e microrganismos para auxiliar no processo de extração (SHE et al., 2019).

Entretanto a corrosão de estruturas metálicas e o *souring* biogênico, acidificação do petróleo, afetam a produção e qualidade do óleo e, assim, acarretam custos operacionais elevados de prevenção e controle de danos (LI et al., 2018a). Nesse tipo de indústria, a corrosão está frequentemente associada a microrganismos, sendo denominada corrosão influenciada por microrganismos (MIC) ou biocorrosão, a qual tem sido uma das principais responsáveis por falhas nas instalações e vazamento de dutos nas últimas décadas (BHAT et al., 2011; HINKSON et al., 2013; LI et al., 2018a).

As bactérias redutoras de sulfato (BRS) são os principais microrganismos associados à MIC em campos de petróleo devido ao ambiente anaeróbico dos reservatórios, diversidade de compostos orgânicos e alta disponibilidade de sulfato presente na água do mar (DOPFFEL et al., 2018). As BRS são procariotos anaeróbios, que utilizam preferencialmente o sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) comoceptor final de elétrons na respiração, compostos orgânicos ou hidrogênio ( $\text{H}_2$ ) como doadores de elétrons para a redução do sulfato. Parte do sulfato, transportado para dentro da célula, é reduzido a sulfeto de hidrogênio,  $\text{H}_2\text{S}$ , um produto altamente corrosivo, com capacidade de deteriorar estruturas metálicas, por reagir rapidamente com o ferro metálico produzindo sulfeto de ferro ( $\text{FeS}$ ), produto característico de corrosão (CAVALCANTI, 2001; ENNING e GARRELFs, 2014). Essa situação é agravada pela capacidade dos microrganismos presentes nos reservatórios em produzirem biofilme onde acumulam os metabólitos decorrentes da atividade microbiana, intensificando o processo de biocorrosão (ENNING e GARRELFs, 2014; XU et al., 2016).

O biofilme é composto por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS - *Extracellular Polymeric Substance*) e células sésseis incorporadas, formando uma comunidade complexa. O biofilme representa uma grande vantagem adaptativa aos microrganismos ali presentes, como proteção contra perturbações ambientais, resistência a biocidas, além de fornecer condições favoráveis ao seu desenvolvimento, devido ao sinergismo que ocorre entre eles (GARRETT et al., 2008; LI et al., 2018a). O biofilme formado por BRS é o responsável pelo aumento da concentração de metabólitos corrosivos como o H<sub>2</sub>S de forma pontual, resultando no *pitting* (corrosão pontual) no interior das instalações metálicas, tornando-se um problema desafiador para as indústrias de petróleo (ENNING e GARRELF, 2014; XU et al., 2016).

Diferentes abordagens são utilizadas para controlar a formação de biofilme de BRS de modo a mitigar os danos causados pela biocorrosão, tais como: a limpeza mecânica e a aplicação de biocidas (VIDELA, 2002; LI et al. 2016b), moduladores de comunidade, como nitrato (HUBERT e VOORDOUW, 2007; DE SOUSA et al., 2010; DOPFFEL et al., 2018) e inibidores metabólicos de BRS (GREENE et al., 2006; CARLSON et al., 2015a; CARLSON et al. 2015b). Entretanto, continuamente são pesquisados métodos alternativos devido a problemas associados a essas abordagens, como altos custos e ecotoxicidade dos biocidas (JIA et al., 2019; LITTLE et al., 2020), ou ainda potenciais contribuições de moduladores de comunidade e inibidores metabólicos para biocorrosão e o *souring* biogênico devido à produção e, ou acúmulo de intermediários reativos (CARLSON et al., 2015a; CARLSON et al., 2015b; JOHNSON et al., 2017; DOPFFEL et al., 2018; LAHME et al., 2019; YUK et al., 2020).

Uma vez que os microrganismos possuem a capacidade de desenvolver resistência a diferentes antimicrobianos, abordagens dinâmicas que possam acompanhar essa evolução bacteriana, como a utilização de bacteriófagos, são de grande interesse, visto que utiliza da co-evolução que já ocorre de forma natural no ambiente (KEEN, 2012; NIKOLICH e FILIPPOV, 2020; YANG et al., 2020). Desse modo, os bacteriófagos têm se mostrado uma alternativa biológica para eliminação de microrganismos devido à sua especificidade e ação bacteriolítica (JOHNSON et al., 2017; YANG et al., 2018; JIA et al., 2019), além do controle do biofilme em diversos setores (PARASION et al., 2014; PEI e LAMAS-SAMANAMUD, 2014; DUARTE et al.,

2018), tais como em indústrias alimentícias (GUTIÉRREZ et al., 2016), manutenção de implantes e cateteres médicos (PIRES et al., 2011; AKANDA et al., 2018), tratamento de águas residuais (GOLDMAN et al., 2009) e, inclusive, em indústrias de petróleo na prevenção e remediação do *souring* e da corrosão em reservatórios de petróleo (SUMMER et al., 2008; SUMMER et al., 2017) e no controle da formação do biofilme em sistemas de osmose reversa em refinarias de petróleo pela ação de bacteriófagos (BELGINI et al., 2014).

Assim como os bacteriófagos, as proteínas fágicas que atuam degradando o peptidoglicano, como as endolisinas e peptidoglicanos hidrolases associadas ao vírion (VAPGH - *Virion-Associated Peptidoglycan Hydrolases*), têm demonstrado atividade lítica contra diferentes espécies bacterianas (YANG et al., 2018). Além disso, essas enzimas são termoestáveis (LAVIGNE et al., 2004; BRIERS et al., 2006; RODRÍGUEZ et al., 2011; PLOTKA et al., 2015) e possuem capacidade de desestruturação do biofilme bacteriano (GUTIÉRREZ et al., 2014). Tais características indicam que as endolisinas e as VAPGHs apresentam grande potencial de aplicação biotecnológica e como alternativa aos biocidas químicos. As VAPGHs foram identificadas no genoma de uma grande quantidade de bacteriófagos (RODRÍGUEZ-RUBIO et al., 2013), mas pouco é conhecido sobre o potencial e atividade dessas enzimas recombinantes sobre os biofilmes bacterianos (TAKÁČ e BLÄSI, 2005; RODRÍGUEZ et al., 2011; PLOTKA et al., 2019).

Mediante o exposto, neste trabalho foi avaliado o potencial de um coquetel composto por seis bacteriófagos, na prevenção da formação e na remoção do biofilme de culturas mistas de bactérias redutoras de sulfato, as quais foram isoladas de diferentes cenários da indústria petrolífera. Ademais, foi avaliada a atividade muralítica de uma VAPGH, codificada pelo bacteriófago vB\_EcoM-UFV13 heteróloga, sobre a formação do biofilme de *Escherichia coli*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Bactérias redutoras de sulfato

As bactérias redutoras de sulfato (BRS) são microrganismos que apresentam grande importância na ciclagem do enxofre, assim como na biorremediação de metais pesados (MARTINS et al., 2012). As BRS são procariotos anaeróbios que utilizam preferencialmente o sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) como aceptor final de elétrons na respiração e compostos orgânicos ou hidrogênio ( $\text{H}_2$ ) como doadores de elétrons (GREIN et al., 2013).

A redução do sulfato ocorre intracelularmente, desse modo, o sulfato é transportado para dentro da célula através da membrana plasmática e é ativado pela enzima ATP sulfurilase, formando adenosina fosfosulfato (APS) como primeiro intermediário. Uma pequena quantidade de sulfato segue a via assimilatória de redução, produzindo cisteínas, a partir das quais outras moléculas biológicas contendo enxofre são derivadas (GREIN et al., 2013). A maior parte do sulfato, então, segue a via dissimilatória de redução, produzindo sulfeto de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{S}$ ) que é excretado pela célula (GREIN et al., 2013). O  $\text{H}_2\text{S}$  é um gás altamente tóxico, explosivo e corrosivo. Morte acidental após a exposição ao  $\text{H}_2\text{S}$  é um perigo conhecido entre os trabalhadores do petróleo, expostos a subprodutos das refinarias (SHIVANTHAN et al., 2013). Por ser um produto altamente corrosivo, o  $\text{H}_2\text{S}$  causa a biocorrosão de instalações sob o biofilme de BRS (GARRETT et al., 2008; GREIN et al., 2013), as quais constituem um dos principais grupos de microrganismos associados à corrosão microbiologicamente influenciada (MIC - *Microbiologically Influenced Corrosion*) (XU et al., 2016; LVE DU, 2018).

### 2.2 Corrosão influenciada por microrganismos

A corrosão é um dos problemas recorrentes em diversas indústrias e gera um grande impacto econômico, com custos operacionais elevados. Estima-se que no mundo, anualmente, 4 trilhões de dólares são gastos com medidas de prevenção e controle de danos associados à corrosão (ENNING e GARRELFSS, 2014; LI et al.,

2018). A corrosão é um processo multifatorial, dependendo fortemente da concentração de oxigênio dissolvido, composição química, condutividade, potencial redox e pH da solução a qual o metal está exposto, assim como, da presença de microrganismos (LITTLE et al., 2020). Nas indústrias de petróleo e gás, a corrosão está frequentemente associada à presença de microrganismos, desse modo, a MIC tem sido um dos principais responsáveis por falhas nas instalações e vazamento de dutos nas últimas décadas (JACOBSON, 2007; BHAT et al., 2011; HINKSON et al., 2013; LI et al., 2018a).

A MIC é um processo complexo, que pode ser iniciado, ou exacerbado, pela presença e atividade de microrganismos, e seus biofilmes, acarretando a degradação de uma ampla gama de metais (BLACKWOOD, 2018; LV e DU, 2018). Muitos microrganismos podem contribuir para a biocorrosão, incluindo bactérias, arqueias e fungos. A maioria dos estudos publicados sobre MIC se concentram em bactérias redutoras de sulfato, bactérias produtoras de ácido, bactérias redutoras de nitrato, bactérias oxidantes de ferro e archaeas metanogênicas (XU et al., 2016; LV e DU, 2018; JIA et al., 2019).

Em campos de petróleo, as BRS estão entre os principais microrganismos associados à MIC devido à produção de metabólitos corrosivos como o  $H_2S$ , que possui a capacidade de deteriorar estruturas metálicas por reagir rapidamente com o ferro metálico, formando sulfeto de ferro,  $FeS$ , produto característico de corrosão (CAVALCANTI, 2001; ENNING e GARRELFIS, 2014). O  $FeS$  pode, ainda, acarretar entupimento de dutos, alterar sua permeabilidade, e conseqüentemente, problemas de injetividade (DOPFFEL et al., 2018). As BRS associadas ao processo de biocorrosão, pertencem principalmente a classe *Deltaproteobacteria* (GARCIA e PROCÓPIO, 2020), se destacando o gênero *Desulfovibrio*, que é comumente encontrado em ambientes aquáticos, ricos em substratos orgânicos e contendo níveis elevados de sulfato (CAVALCANTI, 2001).

As BRS são capazes de danificar estruturas metálicas e contribuir para a MIC, direta ou indiretamente, a partir de mecanismos eletroquímicos classificados em tipo I e II, respectivamente. A MIC do tipo I ou E-MIC (MIC eletrogênica) está associada à transferência de elétrons em um biofilme eletrogênico, no qual o ferro é utilizado como doador de elétrons, para a redução do sulfato pelo metabolismo celular, tendo como produto de corrosão o sulfeto de ferro,  $FeS$  (XU et al., 2016). Como o ferro é insolúvel,

ele é oxidado extracelularmente e os elétrons devem então ser transportados através da parede celular para o citoplasma. Os elétrons podem ser transportados para o citoplasma a partir de proteínas redox ligadas à membrana das células, por transferência de elétrons direta, ou por transferência de elétrons mediada por outras moléculas, como coenzimas (LV e DU, 2018). A MIC do tipo II ou C-MIC (MIC-química) está relacionada a metabólitos corrosivos secretados, no caso, sulfeto de hidrogênio, produto dissimilatório da redução de sulfato (ENNING e GARRELF, 2014).

O sulfeto de hidrogênio, além de acelerar o processo de biocorrosão, ocasiona a acidificação do petróleo, acarretando perdas de qualidade do petróleo (JOHNSON et al., 2017), riscos à segurança das instalações e riscos à saúde dos trabalhadores em decorrência da toxicidade do gás (DOPFFEL et al., 2018). Desse modo, alternativas com intuito de mitigar a biocorrosão e eliminar as BRS na indústria petrolífera são comumente prospectados (JIA et al., 2019; LITTLE et al., 2020).

### **2.3 Biofilme**

Na natureza, os microrganismos, em maior parte, são encontrados em biofilmes, constituindo comunidades organizadas e associados a superfícies ou interfaces, recobertas por uma matriz extracelular constituída de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) (PEI e LAMAS-SAMANAMUD, 2014). A matriz do biofilme é constituída de polissacarídeos, ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos que são secretados pelos próprios microrganismos, revestindo a superfície e envolvendo os agregados celulares (FLEMMING et al., 2007; FLEMMING e WINGENDER, 2010).

A adesão dos microrganismos às superfícies, bióticas ou abióticas, que ocasiona a formação de biofilmes, é um processo complexo que varia com o tipo de superfície aderente, microrganismos presentes, dinâmica do ambiente, temperatura, disponibilidade de nutrientes, oxigênio e pH (GARRETT et al., 2008; FLEMMING e WINGENDER, 2010; COSTA et al., 2017). Em geral, no primeiro momento, moléculas orgânicas ou inorgânicas são depositadas na superfície de contato, promovendo a formação da camada de condicionamento, que permite a aderência de células planctônicas, individualizadas, promovendo a interação inicial. Em seguida, ocorre a

produção e a secreção de polímeros, promovendo a adesão das células à superfície, e prontamente a proliferação celular. A alta densidade celular permite a interação e comunicação entre as células, que são fundamentais para a expressão de genes de adesão e coesão do biofilme, bem como a evasão celular (CAVALCANTI, 2001; CAIXETA, 2008; GARRETT et al., 2008).

O biofilme oferece aos microrganismos diversas vantagens, como a proteção contra dessecação, oxidação, radiação ultravioleta, resistência a biocidas, antibióticos e desinfetantes, promove o sinergismo entre os microrganismos da comunidade e a transferência horizontal de genes (FLEMMING e WINGENDER, 2010). Além disso, a retenção de enzimas extracelulares permite a utilização de componentes da matriz e restos celulares como fonte de energia em condições limitantes, garantindo a manutenção das células (GARRETT et al., 2008; FLEMMING e WINGENDER, 2010).

Embora o biofilme seja vantajoso para a comunidade microbiana, ele é considerado um dos grandes problemas em diversas áreas, exatamente devido à dificuldade de atuação de antimicrobianos e desinfetantes para a remoção completa dos microrganismos (GARRETT et al., 2008). Em ambientes nosocomiais, a infecção oportunista é um dos grandes problemas associados a persistência de microrganismos, uma vez que equipamentos cirúrgicos e linhas fluidas, como por exemplo, bisturis e cateteres (SOUSA e MENDES, 2014), assim como implantes médicos e próteses ortopédicas, são potenciais substratos para a formação de biofilmes, acarretando infecções subseqüentes (AKANDA et al., 2018). Em indústrias alimentícias, os biofilmes afetam linhas de produção, impedindo o fluxo de calor através de superfícies, aumento da resistência dos fluidos devido ao atrito, aumento da taxa de corrosão de tubulações, acarretando contaminações em cadeia, ao longo de toda a linha de produção, gerando um impacto negativo na segurança alimentar e conseqüentes perdas econômicas (GARRETT et al., 2008; GUTIÉRREZ et al., 2016).

O biofilme tem sido diretamente associado a processos de biocorrosão, por BRS, por mediar interações entre a superfície e o ambiente líquido, contribuindo para modificações na interface metal-solução, como por exemplo, alteração da composição e concentração de espécies químicas, alteração de pH e dos níveis de oxigênio na solução a qual o metal se encontra, devido à atividade microbiana (LV e DU, 2018). Além disso, a matriz de EPS também pode se ligar a íons metálicos influenciando no

transporte de elétrons na interface biofilme/metálico, acelerando o processo de corrosão (BEECH e SUNNER, 2004).

## 2.4 Controle dos microrganismos e do biofilme

Diversas abordagens são utilizadas com o intuito de mitigar a biocorrosão e eliminar as BRS na indústria petrolífera. A limpeza mecânica e o uso de biocidas de amplo espectro, como sulfato de tetrakis hidróxido metil fosfônico (THPS), glutaraldeído (Glut), cloreto de benzalcônio (BAC) e cocodiamina, são as abordagens primárias utilizadas com o objetivo de remover fisicamente o biofilme e eliminar os microrganismos dispersos. Embora essas estratégias sejam frequentemente utilizadas, os biofilmes formados pelas BRS são facilmente revertidos e a contínua aplicação de biocidas pode acarretar a seleção de microrganismos resistentes. Há ainda a preocupação ambiental devido à sua ecotoxicidade, além do aumento dos custos para o tratamento (JIA et al., 2019; LITTLE et al., 2020).

Uma alternativa a essas abordagens são os moduladores metabólicos, como nitrato, que ganhou destaque na década anterior, o qual é usado com o objetivo de aumentar o potencial redox do sistema e favorecer o crescimento de bactérias redutoras de nitrato em detrimento das BRS, implicando na redução dos custos de aplicação e agressões ao ambiente comparada aos métodos convencionais (DE SOUSA et al., 2010). Entretanto, devido à diversidade e complexidade das comunidades microbianas dentro dos reservatórios, e, conseqüentemente, nos biofilmes, em alguns casos o uso do nitrato tem sido associado também à biocorrosão e *souring* biogênico (LAHME et al., 2019; YUK et al., 2020). Outra abordagem são os inibidores metabólicos, como nitrito, (per)clorato e molibdato, que ganharam destaque devido à especificidade contra BRS (GREENE et al. 2006; CARLSON et al., 2015a). Entretanto, estudos têm demonstrado potenciais contribuições dessas abordagens para a MIC devido à produção e/ou acúmulo de intermediários reativos (CARLSON et al., 2015a; JOHNSON et al., 2017; DOPFFEL et al., 2018; LAHME et al., 2019).

## 2.5 Bacteriófagos

Devido às falhas e ineficiências nas abordagens utilizadas, continuamente são desenvolvidos novos métodos e metodologias que possam ser eficazes e ambientalmente amigáveis, como os bacteriófagos, também conhecidos como fagos, que são vírus que infectam bactérias e considerados as entidades mais abundantes do planeta (SANTOS et al., 2014; HARADA et al., 2018; NIKOLICH e FILIPPOV, 2020). Os bacteriófagos são parasitas intracelulares obrigatórios e, por não possuírem metabolismo próprio, necessitam do metabolismo, recursos energéticos e das biomoléculas dos seus hospedeiros para sua multiplicação. Os fagos infectam seus hospedeiros por meio de uma variedade de receptores específicos presentes na superfície celular, como carboidratos, lipopolissacarídeos e proteínas (BATINOVIC et al., 2019; ROYER et al., 2021).

Tradicionalmente, a descoberta dos bacteriófagos é atribuída aos microbiologistas Frederick W. Twort (1915) e Félix d'Herelle (1917) que de forma independente, observaram a presença de “halos” nos quais não havia crescimento bacteriano (ABEDON et al., 2011; KEEN, 2012, 2015). D'Herelle foi quem se aprofundou e identificou esse agente bactericida como um vírus parasita bacteriano, ao qual chamou de bacteriófago, do latim “comedores de bactérias” e logo compreendeu que esses antagonistas naturais das bactérias representavam uma nova forma poderosa de tratar infecções bacterianas. Em 1919, D'Herelle realizou ensaios clínicos utilizando bacteriófagos isolados para tratar doenças como erupções cutâneas, cólera, febre tifoide e disenterias, sendo o que consideramos hoje a terapia fágica ou fagoterapia (FRUCIANO e BOURNE, 2007; KEEN, 2012). Apesar dos resultados significativos obtidos por D'Herelle, os resultados obtidos por outros pesquisadores foram inconsistentes. Atualmente, sabe-se que essa variação nos resultados foi devido ao conhecimento restrito que os pesquisadores possuíam naquela época sobre etapas críticas no processo de infecção viral, como a especificidade vírus-hospedeiro, ciclos de vida e cinética de infecção (KEEN, 2012; ENDERSEN et al., 2014).

Esses vírus podem apresentar diversas formas, tamanhos e arranjos, possuem material genético composto por DNA (fita simples ou dupla) ou RNA (fita simples ou

dupla, polaridade positiva ou negativa), envolto em uma capa proteica, podendo possuir ainda uma membrana lipídica. Quanto à sua estrutura podem ser encontrados na forma poliédrica, filamentosa, pleomórfica ou caudada (DUDA, 2008; FLINT et al., 2020). A grande maioria dos fagos descritos na literatura são pertencentes à ordem *Caudovirales*, que engloba 14 famílias, das quais as mais estudadas são a família *Myoviridae* (cauda curta e contrátil), *Siphoviridae* (cauda longa e não contrátil) e *Podoviridae* (cauda curta e não contrátil) (ACKERMANN e PRANGISHVILI, 2012; ICTV, 2020; ROYER et al., 2021).

Os fagos da ordem *Caudovirales* podem ser classificados de acordo com seu ciclo de vida, sendo: lítico, lisogênico, pseudolisogênico e infecção crônica (WITTEBOLE et al., 2014; MACIEJEWSKA et al., 2018). Inicialmente, em comum para todos os ciclos, os vírus reconhecem receptores celulares (processo de adsorção) e liberam seu material genético no interior do hospedeiro, onde irão seguir diferentes ciclos de vida. No ciclo lítico os bacteriófagos utilizam da maquinaria celular para a sua replicação e liberação de novas partículas virais acarretando a lise celular. No ciclo lisogênico, eles possuem a capacidade de integrar seu genoma no genoma bacteriano, tornando-se um profago. Os fagos temperados podem transitar entre o ciclo lítico e lisogênico, dependendo das condições nas quais o hospedeiro se encontra, nesse caso, a bactéria torna-se imune a ataques de outras partículas de bacteriófagos semelhantes. O profago permanece em estado de latência, mesmo com muitas divisões celulares, até que seja ativado, o que ocorre normalmente em decorrência de estresse ao hospedeiro bacteriano. A pseudolisogenia é quando o DNA viral está presente dentro da célula hospedeira de forma episomal (semelhante a um plasmídeo), sendo o hospedeiro, portanto, apenas um portador do genoma viral. Na infecção crônica ocorre liberação constante de novas partículas virais da célula hospedeira por brotamento ou extrusão sem que ocorra a lise celular (WITTEBOLE et al., 2014; MADIRGAN et al., 2016; HARADA et al., 2018; MACIEJEWSKA et al., 2018).

Com o surgimento dos antibióticos no século XX, e a rejeição à fagoterapia devido aos resultados inconsistentes obtidos, a prática entrou em desuso, principalmente no ocidente. Entretanto, atualmente com o constante surgimento de bactérias multirresistentes a drogas e o decaimento do surgimento de novos antibióticos eficazes, retornou o interesse à fagoterapia como alternativa ao controle de microrganismos e dos biofilmes, visto que por serem parasitas intracelulares

obrigatórios essa coevolução é naturalmente comum (ANDERSSON e HUGHES, 2010; KEEN, 2012; O'NEILL, 2016; NIKOLICH e FILIPPOV, 2020).

Dentre as vantagens da utilização de bacteriófagos para o controle de bactérias se destaca a especificidade pelo hospedeiro. Em uma perspectiva clínica, isso significa que os bacteriófagos podem eliminar uma infecção por um microrganismos específico sem afetar a microbiota comensal, com destaque aos fagos líticos, que possuem a capacidade de matar as células bacterianas (KEEN, 2012; JOHNSON et al., 2017; YANG et al., 2018; JIA et al., 2019). Por outro lado, os bacteriófagos têm sido considerados um método alternativo para o controle de biofilmes bacterianos, inclusive de espécies não-relacionadas, ou seja espécies as quais ele não consegue infectar, uma vez que possuem enzimas estruturais que hidrolisam as ligações químicas presentes no biofilme (PARASION et al., 2014; PEI e LAMAS-SAMANAMUD, 2014; DUARTE et al., 2018; FORTI et al. 2018).

Entretanto para a utilização de fagos como agentes terapêuticos algumas características são almejadas, tais como: baixa imunogenicidade, ciclo estritamente lítico, não possuem genes de toxinas, patogenicidade ou de resistência a antibióticos, ter uma ampla gama de hospedeiro e capacidade de restringir o surgimento de mutantes resistentes ao fago (KORTRIGHT et al., 2019; YANG et al., 2020). Embora as bactérias possuam sistemas de defesa contra a infecção por fagos, o que pode acarretar resistência à infecção. A resistência aos fagos pode ocorrer de diversas formas, entre elas por alterações ou perda da estrutura do receptor viral, impedindo o progresso da infecção viral. O desenvolvimento de cepas resistentes pode ser evitado com a utilização de coquetéis fágicos multiespecíficos, não apenas com o intuito de aumentar a probabilidade de infecção a um determinado hospedeiro, a partir do reconhecimentos de diferentes receptores celulares, mas também de erradicar biofilmes, uma vez que diferentes enzimas fágicas, podem atuar sobre o biofilme da comunidade microbiana (ALVES et al., 2016; YANG et al., 2020).

Os inúmeros estudos utilizando coquetéis de fagos reforçam o potencial da sua aplicação. YANG e colaboradores (2020) e ALVES e colaboradores (2016) desenvolveram coquetéis de bacteriófagos que foram eficazes contra diversos isolados clínicos de *P. aeruginosa*. O primeiro trabalho focou na restrição do aparecimento de mutantes resistentes aos fagos, utilizando bacteriófagos que utilizam diferentes receptores celulares, enquanto o segundo, enfocou na utilização de um

coquetel com ampla gama de hospedeiro, para eliminar células planctônicas e reduzir e dispersar os biofilmes sob condições estáticas e dinâmicas. SUMMER e colaboradores (2017) demonstraram o potencial dos bacteriófagos líticos na remediação da acidificação de reservatórios de petróleo, objetivando utilizar os fagos para controlar bactérias dominantes e subdominantes em uma comunidade de BRS.

## **2.6 Peptidoglicano-hidrolases associadas aos vírions**

Peptideoglicano-hidrolases são enzimas que atuam degradando o peptideoglicano, dentre elas temos as endolisinas e as VAPGHs. Tem sido demonstrado que as endolisinas e as VAPGHs, possuem atividade lítica contra diferentes espécies bacterianas (YANG et al., 2018). Além disso, essas enzimas são termoestáveis (LAVIGNE et al., 2004; BRIERS et al., 2006; RODRÍGUEZ et al., 2011; PLOTKA et al., 2015) e possuem capacidade de desestruturar o biofilme bacteriano (GUTIÉRREZ et al., 2014) LAVIGNE e colaboradores (2004), por exemplo, descreveram uma proteína estrutural com domínio de lisozima do fago phiKMV, retendo 26 % de sua atividade após 2 h a 100 °C e 21 % após a autoclavagem . Tais características indicam que as endolisinas e as VAPGHs apresentam grande potencial de aplicação biotecnológica e como alternativa aos biocidas químicos.

VAPGH é uma classe de enzimas líticas codificadas por bacteriófagos que, assim como as endolisinas, possuem a função de clivar enzimaticamente o peptidoglicano da parede celular bacteriana (RODRÍGUEZ-RUBIO et al., 2013), se diferenciando com base em suas funções durante o ciclo de infecção do fago. As VAPGHs são amplamente distribuídas entre os bacteriófagos, atuando na primeira etapa do ciclo de infecção dos bacteriófagos, clivando localmente o peptideoglicano e auxiliando na adsorção dos vírus nas células (NISHIMA et al., 2011). Já as endolisinas são produzidas durante a fase tardia do ciclo lítico, atuando internamente na parede celular, permitindo a liberação da nova progênie viral (RODRÍGUEZ-RUBIO et al., 2013).

As enzimas fágicas, assim como a partícula viral a partir dessas mesmas enzimas, podem interferir no processo de formação e estabilidade do biofilme. Essas

enzimas podem ser estruturais, presentes na cauda e nas fibras da cauda, como depolimerases e as VAPGHs, ou liberadas no processo de lise celular como as endolisinas, todas capazes de degradar a matriz do biofilme. As depolimerases possuem ação direta na degradação do EPS. Dependendo do tipo de ligação química que é hidrolisada, as VAPGHs podem ser classificadas como: (1) amidases, que hidrolisam ligação amida, (2) endopeptidases, que clivam ligações dentro de cadeias de peptídeos e (3) glicosaminidases (muramidases), hidrolisam ligações glicosídicas (DUARTE, 2014; MACIEJEWSKA et al., 2018; DUARTE et al., 2018; CHANG, 2020).

Evidências de que a atividade lítica dos bacteriófagos está relacionada com proteínas específicas associadas aos vírions são obtidas a partir da subclonagem e purificação dessas enzimas e ensaios confirmando da sua atividade antimicrobiana. As VAPGHs HydH5 (RODRÍGUEZ et al., 2011b), gp61 (RASHEL et al., 2008) e p17 (TAKÁČ e BLÄSI, 2005), codificadas pelos fagos phiPLA88, φMR11 e P68, respectivamente, apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, inclusive cepas resistentes à meticilina (TAKÁČ e BLÄSI, 2005). A enzima Ply17, do fago phiYY de *P. aeruginosa*, com atividade de endolisina e VAPGH, também demonstrou atividade antimicrobiana contra *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. epidermidis* e *S. aureus* (YANG et al., 2018).

A atividade antimicrobiana de endolisinas vem sendo confirmada em diversos estudos (RODRÍGUEZ et al., 2011; GUTIÉRREZ et al., 2014; YANG et al., 2018; PLOTKA et al., 2019), assim como seu potencial em impedir a formação de biofilmes (FENTON et al., 2013; SHEN et al., 2013; GUTIÉRREZ et al., 2014). Entretanto, apesar da presença de genes codificadores de VAPGH ter sido detectada em diversos genomas de bacteriófagos, pouco é conhecido sobre a atividade antimicrobiana dessas enzimas expressas e purificadas *in vitro* e sobre sua ação em biofilmes.

O bacteriófago vB\_EcoM-UFV13 (UFV13), membro do gênero *T4virus* (DUARTE et al., 2016), pertencente à coleção de microrganismos do Laboratório de Imunovirologia Molecular. Esse fago mostrou atividade lítica contra *E. coli* em ensaios *in vitro* e eficácia no controle do biofilme formado por *Trueperella pyogenes*. A análise do genoma do fago UFV13 demonstrou a presença de domínios hidrolases, correspondentes a putativas VAPGHs, em 8 ORFs que foram categorizadas utilizando programas computacionais combinados (PHYpred e HyPe), com base na especificidade pelo substrato (Tabela 1) (DUARTE et al., 2018).

Tabela 1 – VAPGHS codificadas pelo bacteriófago vB \_EcoM-UFV13 (UFV13).

ORF	Código da sequência no GenBank	Proteínas Homólogas	Categorização funcional
31	vBEcoMUFV13_g031	Soc1	Hidrolise da parede celular
124	vBEcoMUFV13_g124	IP3	Peptidase
153	vBEcoMUFV13_g153	Gp5	Hidrolise da parede celular/lisozima
157	vBEcoMUFV13_g157	Gp7	LD-carboxipeptidase
160	vBEcoMUFV13_g160	Gp10	N-acetilmuranoil-L-alanina amidase
188	vBEcoMUFV13_g188	Gp25	N-acetilmuranoil-L-alanina amidase
245	vBEcoMUFV13_g245	Gp36	Tranglicosilase D associada a membrana
246	vBEcoMUFV13_g246	Gp37	N-acetil-anhidromuramil-l-alanina amidase

Fonte: A autora

A ORF 246 foi classificada como N-acetil-anhidromuramil-l-alanina amidase, com homologia com a proteína Gp 37 de *T4virus*. A Gp 37 é uma proteína estrutural, referente à fibra da cauda longa do fago T4 de *E. coli* que possui atividade de peptidoglicano-hidrolase (DUARTE et al., 2018). A Gp 37 apresenta 1026 aminoácidos e é responsável por mediar a ligação dos fagos T4 ao receptor celular. Tanto lipopolissacarídeos, quanto a proteína C da membrana externa (OmpC) foram relatados como receptores desses fagos (BARTUAL et al., 2010).

A proteína gp 37 atua na primeira etapa da infecção do fago reconhecendo e mediando a interação com o receptor de superfície do hospedeiro *Escherichia coli*. Nesse processo, pelo menos três das seis fibras da cauda longa reconheceram corretamente seu receptor. Desse modo, a placa basal muda a conformação do hexágono, fazendo com que as fibras da cauda curta, que são homotrímeros paralelos de Gp 12, se liguem irreversivelmente à parede celular da célula hospedeira, possibilitando, conseqüentemente, a contração da bainha da cauda externa e, com isso, a injeção do DNA viral na célula (BARTUAL et al., 2010).

Desse modo, BARTUAL e colaboradores (2010a) expressaram a proteína recombinante Gp 37, de fagos *T4*, em sistema procaríoto e confirmaram a conformação trimérica, importante para sua incorporação na partícula viral.

Entretanto, ainda não se tem a confirmação de sua atividade muralítica contra diferentes microrganismos ou sobre sua ação no biofilme.

## 2.7 REFERÊNCIAS

ABEDON, S. T. et al. Bacteriophage prehistory. **Bacteriophage**, v. 1, n. 3, p. 174–178, maio 2011.

ACKERMANN, H. W.; PRANGISHVILI, D. **Prokaryote viruses studied by electron microscopy** *Archives of Virology* Springer-Verlag Wien, , 1 out. 2012. Disponível em: <<http://www.>>. Acesso em: 8 jun. 2021

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Anuário estatístico brasileiro de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. p. 264, 2019.

AKANDA, Z. Z.; TAHA, M.; ABDELBARY, H. Current review—The rise of bacteriophage as a unique therapeutic platform in treating peri-prosthetic joint infections. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 36, n. 4, p. 1051–1060, 2018.

ALVES, D. R. et al. A novel bacteriophage cocktail reduces and disperses *Pseudomonas aeruginosa* biofilms under static and flow conditions. **Microbial Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 61–74, 1 jan. 2016.

ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. **Antibiotic resistance and its cost: Is it possible to reverse resistance?** *Nature Reviews Microbiology* Nature Publishing Group, , 8 abr. 2010. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrmicro2319>>. Acesso em: 7 jun. 2021

BARTUAL, S. G. ; et al. Two-chaperone assisted soluble expression and purification of the bacteriophage T4 long tail fibre protein gp37. **Protein Expression and Purification**, v. 70, n. 1, p. 116–121, mar. 2010.

BATINOVIC, S. et al. Bacteriophages in natural and artificial environments. **Pathogens**, v. 8, n. 3, p. 100, 1 set. 2019.

BEECH, I. B.; SUNNER, J. Biocorrosion: Towards understanding interactions between biofilms and metals. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 181–186, 2004.

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, 1 out. 2014.

BHAT, S.; KUMAR, BIPIN; PRASAD, S. R.; KATARKI, M. V. Failure of a new 8-in pipeline from group gathering station to central tank farm. **Materials Performance**, v. 50, n. 5, p. 50–54, 2011.

BLACKWOOD, D. An Electrochemist Perspective of Microbiologically Influenced Corrosion. **Corrosion and Materials Degradation**, v. 1, n. 1, p. 59–76, 2018.

BRIERS, Y. et al. Stability analysis of the bacteriophage  $\phi$ KMV lysin gp36C and its putative role during infection. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 16, p. 1899–1905, 2006.

CAIXETA, D. S. **Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de Pseudomonas em superfície de aço inoxidável**. [s.l.] Dissertação (mestrado) - Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras. Lavras, p.86, 2008.

CARLSON, H. K.; KUEHL, J. V.; HAZRA, A. B.; JUSTICE, N. B.; STOEVA, M. K.; SCZESNAK, A.; MULLAN, M. R.; IAVARONE, A. T.; ENGELBREKTSON, A.; PRICE, M. N.; DEUTSCHBAUER, A. M.; ARKIN, A. P.; COATES, J. D. Mechanisms of direct inhibition of the respiratory sulfate-reduction pathway by (per)chlorate and nitrate. **ISME Journal**, v. 9, n. 6, p. 1295--1305, 2015.

CARLSON, H. K.; STOEVA, M. K.; JUSTICE, N. B.; SCZESNAK, A.; MULLAN, M. R.; MOSQUEDA, L. A.; KUEHL, J. V.; DEUTSCHBAUER, A. M.; ARKIN, A. P.; COATES, J. D. Monofluorophosphate is a selective inhibitor of respiratory sulfate-reducing microorganisms. **Environmental Science and Technology**, v. 49, n. 6, p. 3727–3736, 2015.

CAVALCANTI, G. D. H. **Efeito de biocidas sobre biofilmes bacterianos envolvidos em processos de biocorrosão em plataformas marítimas da Petrobras**. [s.l.] Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, p.142, 2001.

CHANG, Y. **Bacteriophage-derived endolysins applied as potent biocontrol agents to enhance food safety** *Microorganisms* MDPI AG, , 1 maio 2020. Disponível em: </pmc/articles/PMC7285104/>. Acesso em: 7 jun. 2021

COSTA, K. A. D. .; FERENZ, M.; SILVEIRA, S. M.; MILLEZI, A. F. Formação de biofilmes bacterianos em diferentes superfícies de indústrias de alimentos. **Revista do Instituto de laticínios Cândido Tostes**, v. 71, n. 2, p. 75–82, 2017.

DE SOUSA, K. A.; CAMMAROTA, M. C.; CAMPORESE, E. F. S. Efeito da aplicação de nitrato na redução biogênica de sulfeto sob diferentes concentrações iniciais de bactérias redutoras de nitrato e sulfato. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 273–278, 2010.

DOPFFEL, N.; KÖGLER, F.; HARTMANN, H.; COSTEA, P. I.; MAHLER, E.; HEROLD, A.; ALKAN, H. Microbial induced mineral precipitations caused by nitrate treatment for souring control during microbial enhanced oil recovery (MEOR). **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 135, p. 71–79, 2018.

DUARTE, V. S.; DIAS, R. S.; KROPINSKI, A. M.; VIDIGAL, P. M. P.; SOUSA, F. O.; XAVIER, A. S.; SILVA, C. C.; DE PAULA, S. O. Complete genome sequence of vB\_EcoM-UFV13, a new bacteriophage able to disrupt *Trueperella pyogenes* biofilm. **Genome Announcements**, v. 4, n. 6, p. 4–5, 2016.

DUARTE, V. S.; DIAS, R. S.; KROPINSKI, A. M. .; XAVIER, A. S.; FERRO, C. G.; VIDIGAL, P. M. P.; SILVA, C. C.; DE PAULA, S. O. A T4virus prevents bio fi lm formation by *Trueperella pyogenes*. **Veterinary Microbiology**, v. 218, n. 2, p. 45–51, 2018.

DUARTE, V. D. S. **Avaliação da atividade lítica dos bacteriófagos vB\_TpyM\_UFV13, vB\_TpyP\_UFV21 e vB\_TpyM\_UFV26 específicos para *Trueperella pyogenes* associada a problemas reprodutivos no puerpério.** [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2014.

DUDA, R. L. Icosahedral Tailed dsDNA Bacterial Viruses. In: **Encyclopedia of Virology.** [s.l.] Elsevier Ltd, 2008. p. 30–37.

ENDERSEN, L. et al. Phage therapy in the food industry. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 5, n. 1, p. 327–349, 2014.

ENNING, D.; GARRELF, J. Corrosion of iron by sulfite-reducing bacteria: New views of an old problem. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 4, p. 1226–1236, 2014.

FENTON, M. et al. Bacteriophage-derived peptidase CHAPK eliminates and prevents

staphylococcal biofilms. **International Journal of Microbiology**, v. 2013, n. 625341, p. 8, 2013.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 623–633, 2010.

FLEMMING, H. C.; NEU, T. R.; WOZNIAK, D. J. The EPS matrix: The “House of Biofilm Cells”. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 22, p. 7945–7952, 2007.

FLINT, J. et al. **Principles of Virology, Volume 1: Molecular Biology**. 5th Editio ed. [s.l: s.n.].

FORTI, F.; ROACH, D. R.; CAFORA, M.; PASINI, M. E.; HORNER, D. S.; FISCARELLI, E. V.; ROSSITTO, M.; CARIANI, LI.; BRIANI, F.; DEBARBIEUX, L.; GHISOTTI, D. Design of a broad-range bacteriophage cocktail that reduces pseudomonas aeruginosa biofilms and treats acute infections in two animal models. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 6, p. 13, 2018.

FRUCIANO, E.; BOURNE, S. **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. **Anais...Hindawi Limited**, 2007Disponível em: [/pmc/articles/PMC2542891/](https://doi.org/10.1155/2007/2542891). Acesso em: 7 jun. 2021

GARCIA, M.; PROCÓPIO, L. Distinct Profiles in Microbial Diversity on Carbon Steel and Different Welds in Simulated Marine Microcosm. **Current Microbiology**, v. 77, p. 967–978, 2020.

GARRETT, T. R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, v. 18, n. 9, p. 1049–1056, 2008.

GOLDMAN, G.; STAROSVETSKY, J.; ARMON, R. Inhibition of biofilm formation on UF membrane by use of specific bacteriophages. **Journal of Membrane Science**, v. 342, n. 1–2, p. 145–152, 2009.

GREENE, E. A.; BRUNELLE, V.; JENNEMAN, G. E.; VOORDOUW, G. Synergistic inhibition of microbial sulfide production by combinations of the metabolic inhibitor nitrite and biocides. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 12, p. 7897–7901, 2006.

GREIN, F.; RAMOS, A. R.; VENCESLAU, S. S.; PEREIRA, I. A. C. Unifying concepts

in anaerobic respiration: Insights from dissimilatory sulfur metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1827, n. 2, p. 146–160, 2013.

GUTIÉRREZ, D.; RODRÍGUEZ-RUBIO, L.; MARTÍNEZ, B.; RODRÍGUEZ, A.; GARCÍA, P. Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 825, p. 15, 2016.

GUTIÉRREZ, D. . et al. Effective removal of staphylococcal biofilms by the endolysin LysH5. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. 8, 2014.

HARADA, L. K. et al. **Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art** **Microbiological Research** Elsevier GmbH, , 1 jul. 2018.

HINKSON, D.; WHEELER, C.; ONEY, C.; KEASLER, V. **MIC in a CO<sub>2</sub> gathering line? A field case study of microbiologically influenced corrosion**. NACE - International Corrosion Conference Series. **Anais...**2013

HUBERT, C.; VOORDOUW, G. Oil field souring control by nitrate-reducing *Sulfurospirillum* spp. that outcompete sulfate-reducing bacteria for organic electron donors. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 8, p. 2644–2652., 2007.

ICTV - INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. **Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses**. Disponível em: <[https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna\\_viruses/67/caudovirales](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/67/caudovirales)>. Acesso em: 8 jun. 2021.

JACOBSON, G. A. Corrosion at Prudhoe Bay - A lesson on the line. **Materials Performance**, v. 48, n. 8, p. 26–34, 2007.

JIA, R.; UNSAL, T.; XU, D.; LEKBACH, Y.; GU, T. Microbiologically influenced corrosion and current mitigation strategies: A state of the art review. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 137, p. 42–58, 2019.

JOHNSON, R. J.; FOLWELL, B. D.; WIREKOH, A.; FRENZEL, M.; SKOVHUS, T. L. Reservoir Souring – Latest developments for application and mitigation. **Journal of Biotechnology**, v. 256, p. 57–67, 2017.

KEEN, E. C. Phage therapy: Concept to cure. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. JUL, 2012.

KEEN, E. C. A century of phage research: Bacteriophages and the shaping of modern biology. **BioEssays**, v. 37, n. 1, p. 6–9, 1 jan. 2015.

KORTRIGHT, K. E. et al. **Phage Therapy: A Renewed Approach to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria** Cell Host and Microbe Cell Press, , 13 fev. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30763536/>>. Acesso em: 7 jun. 2021

LAHME, S.; ENNING, D.; CALLBECK, C. M.; VEGA, D. M. .; CURTIS, T. P.; HEAD, I. M. .; HUBERT, C. R. J. Metabolites of an oil field sulfideoxidizing, nitrate-reducing *Sulfurimonas* sp. cause severe corrosion. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 3, p. 12, 2019.

LAVIGNE, R.; BRIERS, Y.; HERTVELDT, K.; ROBBEN, J.; VOLCKAERT, G. Identification and characterization of a highly thermostable bacteriophage lysozyme. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, n. 21, p. 2753–2759, 2004.

LI, Y.; JIA, R.; AL-MAHAMEDH, H. H.; XU, D.; GU, T. Enhanced biocide mitigation of field biofilm consortia by a mixture of D-amino acids. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 896, p. 13, 2016.

LI, Y.; XU, D.; CHEN, C.; LI, X.; JIA, R.; ZHANG, D.; SAND, W.; WANG, F.; GU, T. Anaerobic microbiologically influenced corrosion mechanisms interpreted using bioenergetics and bioelectrochemistry: A review. **Journal of Materials Science and Technology**, v. 34, n. 10, p. 1713–1718, 2018.

LITTLE, B.J.; BLACKWOOD, D.J.; HINKS, J.; LAURO, F.M.; MARSILI, E.; OKAMOTO, A.; RICE, S.A.; WADE, S.A.; FLEMMING, H. C. Microbially influenced corrosion – any progress? **Corrosion Science**, v. 170, n. 108641, p. 17, 2020.

LV, M.; DU, M. A review: microbiologically influenced corrosion and the effect of cathodic polarization on typical bacteria. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 17, p. 331–346, 2018.

MACIEJEWSKA, B.; OLSZAK, T.; DRULIS-KAWA, Z. **Applications of bacteriophages versus phage enzymes to combat and cure bacterial infections: an ambitious and also a realistic application?** **Applied Microbiology and Biotechnology** Springer Verlag, , 1 mar. 2018. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC5847195/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30763536/)>. Acesso em: 8 jun. 2021

- MADIRGAN, M. T. . et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. [s.l.] Artmed, 2016. v. 39
- MARTINS, M.; TABORDA, R.; SILVA, G.; ASSUNÇÃO, A.; MATOS, A.P.; COSTA, M. C. Aluminum and sulphate removal by a highly Al-resistant dissimilatory sulphate-reducing bacteria community. **Biodegradation**, v. 23, n. 5, p. 693-7–3, 2012.
- NIKOLICH, M. P.; FILIPPOV, A. A. **Bacteriophage therapy: Developments and directions**AntibioticsMDPI AG, , 1 mar. 2020. Disponível em: </pmc/articles/PMC7148498/>. Acesso em: 7 jun. 2021
- NISHIMA, W.; KANAMARU, S.; ARISAKA, F.; KITAO, A. Screw motion regulates multiple functions of T4 phage protein gene product 5 during cell puncturing. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 34, p. 13571–13576, 2011.
- O'NEILL, J. **TACKLING DRUG-RESISTANT INFECTIONS GLOBALLY: FINAL REPORT AND RECOMMENDATIONS THE REVIEW ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE CHAIRED BY JIM O'NEILL**. [s.l: s.n.].
- PARASION, S.; KWIATEK, M.; GRYKO, R.; MIZAK, L.; MALM, A. Bacteriophages as an alternative strategy for fighting biofilm development. **Polish Journal of Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 137–145, 2014.
- PEI, R.;LAMAS-SAMANAMUD, G. R. Inhibition of biofilm formation by T7 bacteriophages producing quorum-quenching enzymes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 17, p. 5340–5348, 2014.
- PIRES, D. et al. Use of newly isolated phages for control of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and ATCC 10145 biofilms. **Research in Microbiology**, v. 162, n. 8, p. 798–806, out. 2011.
- PLOTKA, M.; KACZOROWSKA, A. K.; MORZYWOLEK, A.; MAKOWSKA, J.; KOZLOWSKI, L. P.; THORISDOTTIR, A.; SKÍRNISDOTTIR, S.; HJÖRLEIFSDOTTIR, S.; FRIDJONSSON, O. H.; HREGGVIDSSON, G. O.; KRISTJANSSON, J. K.; DABROWSKI, S.; BUJNICKI, J. M.; KACZOROWSKI, T. Biochemical characterization and validation of a catalytic site of a highly thermostable Ts2631 endolysin from the *Thermus scotoductus* phage vB-Tsc2631. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 19, 2015.
- PLOTKA, M. et al. Structure and function of the Ts2631 endolysin of *Thermus scotoductus* phage vB\_Tsc2631 with unique N-terminal extension used for

peptidoglycan binding. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1261, p. 14, 2019.

RASHEL, M.; UCHIYAMA, J.; TAKEMURA, I.; HOSHIBA, H.; UJIHARA, T.; TAKATSUJI, H.; HONKE, K.; MATSUZAKI, S. Tail-associated structural protein gp61 of *Staphylococcus aureus* phage  $\phi$ mR11 has bifunctional lytic activity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 284, n. 1, p. 9–16, 2008.

RODRÍGUEZ-RUBIO, L.; MARTÍNEZ, B.; DONOVAN, D. M.; RODRÍGUEZ, A.; GARCÍA, P. Bacteriophage virion-associated peptidoglycan hydrolases: Potential new enzymotics. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 427–434, 2013.

RODRÍGUEZ, L. et al. Lytic activity of the virion-associated peptidoglycan hydrolase HydH5 of *Staphylococcus aureus* bacteriophage vB-SauS-phiPLA88. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 138, p. 1–11, 2011a.

RODRÍGUEZ, L. et al. Lytic activity of the virion-associated peptidoglycan hydrolase HydH5 of *Staphylococcus aureus* bacteriophage vB-SauS-phiPLA88. **BMC Microbiology**, 2011b.

ROYER, S.; MORAIS, A. P.; DA FONSECA BATISTÃO, D. W. **Phage therapy as strategy to face post-antibiotic era: a guide to beginners and experts** *Archives of Microbiology* Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, , 1 maio 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00203-020-02167-5>>. Acesso em: 7 jun. 2021

SANTOS, S. B. et al. Population dynamics of a *Salmonella* lytic phage and its host: Implications of the host bacterial growth rate in modelling. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. 102507, 22 jul. 2014.

SHE, H.; KONG, D.; LI, Y.; HU, Z.; GUO, H. Recent Advance of Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR) in China. **Geofluids**, v. 2019, n. 1871392, p. 1–16, 2019.

SHEN, Y.; KÖLLER, T.; KREIKEMEYER, B.; NELSON, D. C. Rapid degradation of *Streptococcus pyogenes* biofilms by PlyC, a bacteriophage-encoded endolysin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 8, p. 1818–1824, 2013.

SHIVANTHAN, M. C. et al. **Hydrogen sulphide inhalational toxicity at a petroleum refinery in Sri Lanka: A case series of seven survivors following an industrial accident and a brief review of medical literature** *Journal of Occupational*

**Medicine and Toxicology** BioMed Central, , 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24111111/>. Acesso em: 1 jul. 2021

SOUSA, P.; MENDES, W. **Segurança do paciente: conhecendo os riscos nas organizações de saúde**. 2nd ed. ed. [s.l.] Editora Fiocruz, 2014.

SUMMER, ELIZABETH J.; LIU, MEI ; SUMMER, NEIL S.; BALDWIN, D. **Prevention and Remediation of Petroleum Reservoir Souring and Corrosion by Treatment with Virulent Bacteriophage**, 2017. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/US9650272B2/en>

SUMMER, N. S. .; SUMMER, ELIZABETH J.; GILL, JASON; YOUNG, R. **Phage Remediation of Microbe Induced Corrosion**. 17th International Corrosion Congresso. **Anais...** Las Vegas, Nevada: 2008 Disponível em: <https://nace.confex.com/nace/ICC08/webprogram/Paper3343.html>. Acesso em: 9 jun. 2021

TAKÁČ, M.; BLÄSI, U. Phage P68 virion-associated protein 17 displays activity against clinical isolates of Staphylococcus aureus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2005.

VIDELA, H. A. Prevention and control of biocorrosion. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 49, n. 4, p. 259–270, 2002.

WITTEBOLE, X.; DE ROOCK, S.; OPAL, S. M. **A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens** Virulence Taylor and Francis Inc., , 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24111111/>. Acesso em: 8 jun. 2021

XU, D.; LI, Y.; GU, T. Mechanistic modeling of biocorrosion caused by biofilms of sulfate reducing bacteria and acid producing bacteria. **Bioelectrochemistry**, v. 110, p. 52–58, 2016.

YANG, Y.; LE, S.; SHEN, W.; CHEN, Q.; HUANG, Y.; LU, S.; TAN, Y.; LI, M.; HU, F.; LI, Y. Antibacterial activity of a lytic enzyme encoded by Pseudomonas aeruginosa double stranded RNA Bacteriophage phiYY. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 1778, p. 1–7, 2018.

YANG, Y. et al. Development of a Bacteriophage Cocktail to Constrain the Emergence

of Phage-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 327, 4 mar. 2020.

YUK, S. K.; AZAM, A. H.; MIYANAGA, K.; TANJI, Y. The contribution of nitrate-reducing bacterium *Marinobacter* YB03 to biological souring and microbiologically influenced corrosion of carbon steel. **Biochemical Engineering Journal**, v. 156, p. 1–27, 2020.

### **3. CAPÍTULO 1: EFEITO DO COQUETEL DE BACTERIÓFAGOS NÃO-ESPECÍFICO SOBRE O BIOFILME DE CULTURAS MISTAS DE BRS DE DIFERENTES CENÁRIOS PETROLÍFEROS**

#### **3.1 INTRODUÇÃO**

A corrosão influenciada por microrganismo (MIC) ou biocorrosão tem sido um dos grandes problemas enfrentados pelas indústrias de petróleo, acarretando falhas nas instalações e vazamento de dutos (BHAT et al, 2011; HINKSON et al., 2013; JACOBSON, 2007; LI et al., 2018). Tais problemas ocasionam grandes impactos econômicos devido a custos operacionais elevados de prevenção e de controle dos danos (LI et al. , 2018).

A MIC é um processo complexo, que pode ser iniciado, ou exacerbado, pela presença e atividade de microrganismos e seus biofilmes, acarretando a degradação de uma ampla gama de metais (BLACKWOOD, 2018; LV e DU, 2018). Em campos de petróleo, as bactérias redutoras de sulfato (BRS) estão entre os principais microrganismos associados à MIC devido a produção de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), um metabólito corrosivo com capacidade de deteriorar estruturas metálicas (CAVALCANTI, 2001; ENNING e GARRELFs, 2014). O biofilme formado por BRS é o responsável pelo aumento da concentração de metabólitos corrosivos no interior das instalações metálicas, tornando-se um problema desafiador para as indústrias de petróleo (LI et al. , 2018).

Diferentes abordagens são utilizadas na mitigação de BRS e do biofilme, como a limpeza mecânica e a aplicação de biocidas, como o sulfato de tetrakis hidróxido metil fosfônico (THPS). O THPS é um biocida comumente utilizado em campos de petróleo, pertencente à classe dos biocidas quimicamente reativos, que agem inativando os microrganismos por reações químicas irreversíveis, perdendo sua função após a reação. Entretanto, biocidas quimicamente reativos, por serem biodegradáveis, necessitam de continua e progressiva aplicação, levando ao aumento significativo dos gastos e preocupação ambiental devido à sua ecotoxicidade (JIA et al., 2019; LITTLE et al., 2020).

Métodos alternativos de modulação de comunidade e inibidores metabólicos têm sido associados ao aumento da biocorrosão e de *souring*, devido a isso, novas metodologias são almejadas (DE SOUSA et al., 2010; GREENE et al., 2006; LAHME et al., 2019; YUK et al., 2020). Ferramentas alternativas e dinâmicas como os bacteriófagos apresentam potencial biotecnológico para o biocontrole de bactérias neste tipo de indústria, uma vez que têm se mostrado uma alternativa biológica para eliminação de microrganismos devido à sua especificidade e a ação bacteriolítica, além do controle do biofilme (BELGINI et al., 2014; SUMMER et al., 2017; SUMMER et al., 2008).

A aplicação de coquetéis fágicos não-específicos aumenta a probabilidade de infecção a um determinado hospedeiro e atuação sobre o biofilme de diferentes microrganismos, uma vez que vírus que possuem diferentes organismos como hospedeiros são mais virulentos, apresentando uma vantagem para a utilização dos fagos não-específicos (ROSS; WARD; HYMAN, 2016). O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de um coquetel multiespecífico, composto por seis bacteriófagos, na prevenção da formação e remoção do biofilme de culturas mistas de bactérias redutoras de sulfato isoladas de diferentes cenários da indústria petrolífera. Tais bacteriófagos utilizados na formulação do coquetel foram capazes também de reduzir a formação do biofilme de diferentes enterobactérias, em estudos prévios, demonstrando a qualificação dos fagos descritos como promissores componentes de coquetéis fágicos no controle do biofilme de culturas mistas.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Isolamento, propagação e titulação viral

Os bacteriófagos vB\_Cfr-UFV1 (C1) e vB\_Ecl-UFV1 (Ent) foram isolados a partir de amostras coletadas na rede de esgoto de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. As amostras de esgoto foram processadas, por centrifugação a 10.000 rpm, 4 °C, por 15 min e o sobrenadante recuperado e filtrado, primeiramente em membrana PES de 0,45 µm (Millipore, EUA), para retirar compostos orgânicos ainda em suspensão, seguido por uma segunda filtração em membrana de 0,22 µm para esterilizar a suspensão viral (DUARTE et al., 2018).

Uma alíquota de 1 mL da suspensão viral filtrada foi adicionada a 30 mL de inóculo contendo a bactéria hospedeira cultivada em meio Luria Bertani (LB) (10 g de NaCl 2, 10 g de peptona e 5 g de extrato de levedura) em fase exponencial de crescimento (D.O<sub>600nm</sub> 0,7). A densidade óptica, ou D.O, das culturas foi medida por espectrofotometria no comprimento de onda de 600 nm (D.O<sub>600nm</sub>) de forma a inferir a fase do crescimento bacteriano. A mistura então foi incubada a 37 °C, 180 rpm, por 16 h para a propagação viral. Foram utilizados como hospedeiros para o isolamento viral *C. freudi* ATCC 8090 e *E. cloacae* ATCC 1307, pertencentes ao acervo de microrganismos do Laboratório de Imunovirologia Molecular (LIVM) da Universidade Federal de Viçosa, campus Viçosa (Minas Gerais, Brasil), para o isolamento dos fagos C1 e Ent, respectivamente.

O propagado foi centrifugado a 5.000 rpm, 4 °C por 20 min e filtrado em membrana de 0,22 µm. Posteriormente, 100 µL dessa suspensão viral enriquecida foi adicionado em um microtubo de 1,5 mL contendo 900 µL de bactéria em DO<sub>600nm</sub> 0,7. A amostra foi incubada por 30 min a 37 °C, para permitir a adsorção viral. A mistura foi então plaqueada pelo método de dupla camada e incubada durante a noite a 37 °C. Após a incubação as placas de lise observadas com morfologias distintas foram recortadas e propagadas individualmente em um novo inóculo de bactéria em DO<sub>600nm</sub> 0,7. A suspensão viral proveniente das placas de lises isoladas foi submetida ao mesmo processo de propagação e plaqueamento por 3 vezes consecutivas, garantindo o isolamento do bacteriófago.

Após confirmação do isolamento, o título viral foi determinado como descrito em Sambrook et al., (2001), a partir da diluição seriada da amostra viral e plaqueamento por dupla camada, como descrito anteriormente. Os estoques virais foram armazenados a 4 °C em glicerol 50 % (v/v).

### 3.2.2 Análise morfológica dos bacteriófagos

Para a classificação taxonômica dos bacteriófagos isolados foi analisada a morfologia por meio da microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para tal, 12 mL de suspensão viral, (C1  $6,2 \times 10^8$  UFP/mL e Ent  $5,0 \times 10^{11}$  UFP/mL), foram purificados por ultracentrifugação (Bechman Coulter, EUA) utilizando 1 mL de colchão de sacarose 20 % (m/v), a 15.000 rpm, 4 °C por 7 h, (BOURDIN et al., 2014). O *pellet* formado foi recuperado em 1 mL de água ultrapura e armazenado a -20 °C.

Para a microscopia, 10 µL da suspensão viral purificada foram depositados em *grids* de microscopia eletrônica, previamente revestidas com FormVar®, por 5 min à temperatura ambiente. O excesso de amostra foi removido utilizando papel absorvente. As partículas virais foram contrastadas negativamente utilizando acetato de uranila 2 % (m/v) por 20 s, o excesso também foi removido, seguido da deposição das *grids* na caixa de armazenamento para posterior observação.

As preparações foram submetidas à análise por microscopia eletrônica de transmissão, modelo ZEISS® EM 109 operando a 80 Kv, no Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da UFV. As imagens foram analisadas usando *ImageJ* (<https://imagej.nih.gov>) para avaliar as dimensões do capsídeo e estruturas virais (ABRÀMOFFF et al., 2005; SCHNEIDER et al., 2012). Os bacteriófagos foram classificados morfolologicamente de acordo com os critérios estabelecidos pelo Comitê Internacional de Taxonomia dos vírus (ICTV).

### 3.2.3 Culturas bacterianas e condições de cultivo

Culturas mistas de diferentes cenários petrolíferos (Tabela 1) foram cedidas pela Petrobras, Brasil, para os ensaios de biofilme. As culturas foram cultivadas em

meio *Postgate E* modificado, sem  $\text{FeSO}_4$ , (0,5 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,0 g/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1,0 g/L de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 0,74 g/L de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 2,01 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1,0 g/L de extrato de levedura, 0,1 g/L de ácido ascórbico, 7 mL/L de lactato de sódio 50 % (m/v), 4,0 mL/L de resazurina 0,025 % (m/v), 0,13 g/L de tioglicolato de sódio em água do mar pH = 7,6) (POSTGATE, 1984) em anaerobiose a 30 °C por 7 dias. Repiques com 10 % de cultura foram realizados por 3 semanas consecutivas, de modo a obter culturas ativas.

Tabela 1 – Culturas mistas obtidas de diferentes cenários e plataformas de petróleo, cedidas pela Petrobras, Brasil, utilizadas nos ensaios de biofilme.

Cultura mista	Origem	Localização
P47	Tanque armazenamento de petróleo	Bacia de Campos, Brasil
P48SEP	Separador de produção	Bacia de Campos, Brasil
P37	Tanque <i>Slop</i>	Bacia de Campos, Brasil
P55	Água de injeção	Bacia do Espírito Santo, Brasil
UO-RIO	Água de injeção (Mistura de várias plataformas)	Bacia de Santos, Brasil

Fonte: A autora

### 3.2.4 Formulação do coquetel de bacteriófagos

O coquetel de fagos utilizado neste trabalho foi montado com 6 bacteriófagos isolados de cinco hospedeiros diferentes (Tabela 2), selecionados de acordo com ensaios anteriores em microplacas de poliestireno os quais demonstraram a capacidade dos bacteriófagos selecionados em reduzir a formação do biofilme em diversas culturas. Composto este coquetel temos o vB\_Cfr-UFV1 (C1), vB\_Ecl-UFV1 (Ent), fago vB\_EcoM-UFV13 (UFV13) (DUARTE et al., 2018; DUARTE et al., 2016), vB\_EcoM-UFV09 (UFV9) (DA SILVA, 2019), vB\_SmaP-UFV01 (VIEIRA, 2019) e vB\_MluM-15 (UFV15) (dados não publicados). O coquetel foi montado com cada bacteriófago possuindo título final de  $1,0 \times 10^8$  UFP/mL, exceto pelo fago vB\_SmaP-UFV01, com título viral de  $1,0 \times 10^7$  UFP/mL, assim como também foram os títulos dos fagos para os ensaios dos mesmos separadamente.

Tabela 2 – Espécies bacterianas utilizadas como hospedeiros para o isolamento dos bacteriófagos que compõe o coquetel.

Bactéria hospedeira	Identificação	Bacteriófago isolado	Referência
<i>Escherichia coli</i>	30	vB_EcoM-UFV13 (UFV13)	(DA SILVA DUARTE et al., 2018)
		vB_EcoM_UFV09 (UFV9)	(DA SILVA, 2019)
<i>Serratia marcescens</i>	MIND01	vB_SmaP-UFV01 (UFV01)	(VIEIRA, 2019)
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC8090	vB_Cfr-UFV1 (C1)	
<i>Enterobacter cloacae subsp cloacae</i>	ATCC13047	vB_Ecl-UFV1 (Ent)	
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC4698	vB_MluM-15 (UFV15)	

Fonte: A autora

### 3.2.5 Ensaio de atividade sobre biofilmes

Os ensaios de avaliação do efeito dos fagos separadamente e do coquetel fágico na prevenção da formação do biofilme foram realizados em placas de 96 poços. Foi usado como controle positivo o THPS, um biocida amplamente utilizado para o controle de BRS (LI et al., 2016).

Uma alíquota de 20 µL dos fagos com título de 10<sup>8</sup> UFP/mL (isolados e coquetel), foram adicionados a 180 µL da cultura de interesse, ativa e diluída 10x em meio *Postgate E* modificado sem FeSO<sub>4</sub>, de modo a obter um título viral de 10<sup>7</sup> UFP/mL em cada poço. Os controles foram realizados com 20 µL de LB, para o controle negativo, e 20 µL de THPS (200 ppm), para controle positivo. As placas foram então incubadas a 30 °C, em câmara de anaerobiose, *Whitley A95 Anaerobic Workstation* (Don Whitley Scientific, Reino Unido), sob atmosfera de H<sub>2</sub> (10%), CO<sub>2</sub> (10%) e N<sub>2</sub> (80%). O biofilme foi avaliado após 4 dias de incubação, pelo método de cristal violeta e leitura por espectrofotometria a 590 nm (DUARTE et al., 2018).

Para análise referente à remoção do biofilme pré-formado pelos fagos separadamente e o coquetel fágico, 200 µL da cultura de interesse, ativa e diluída 10x

em meio *Postgate E* modificado sem  $\text{FeSO}_4$ , foram adicionados em placas de 96 poços e incubadas a 30 °C por 4 dias, em câmara de anaerobiose, para a formação prévia do biofilme. Após a formação do biofilme, o meio de cultura foi removido e 20  $\mu\text{L}$  dos fagos com título de  $10^8$  UFP/mL (isolados e coquetel) e 180  $\mu\text{L}$  meio *Postgate E* modificado sem  $\text{FeSO}_4$  foram adicionados em cada poço. Os controles foram realizados com 20  $\mu\text{L}$  de LB, para o controle negativo, e 20  $\mu\text{L}$  de THPS (200 ppm), para controle positivo. As placas foram então incubadas a 30 °C por 24 h, em câmara de anaerobiose. Após incubação, o biofilme foi avaliado pelo método de cristal violeta e leitura por espectrofotometria a 590 nm.

Brevemente, o método de cristal violeta para quantificação do biofilme consistiu na remoção do meio cultura e lavagem consecutiva dos poços com solução salina 0,9 % (m/v), para a remoção das células planctônicas. A placa foi seca em estufa a 60 °C e o biofilme fixado com metanol por 15 min. As células aderentes foram então coradas com solução de cristal violeta 0,1% (m/v) por 15 min à temperatura ambiente. Os poços foram lavados duas vezes com solução salina, secos em estufa a 60 °C e, por fim, o corante foi dissolvido em 250  $\mu\text{L}$  de etanol-acetona (80:20 v/v) para a quantificação do biofilme. A absorbância dos poços foi analisada no comprimento de onda de 590 nm, utilizando o espectrofotômetro Multiskan™ GO (Thermo Scientific, EUA).

### 3.2.6 Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em cinco replicatas e a significância estatística foi avaliada pelo teste T de *Student*, usando o programa *GraphPad Prism* 6 (GraphPad Software, EUA). Os valores foram considerados estatisticamente significativos se  $P < 0,05$ .

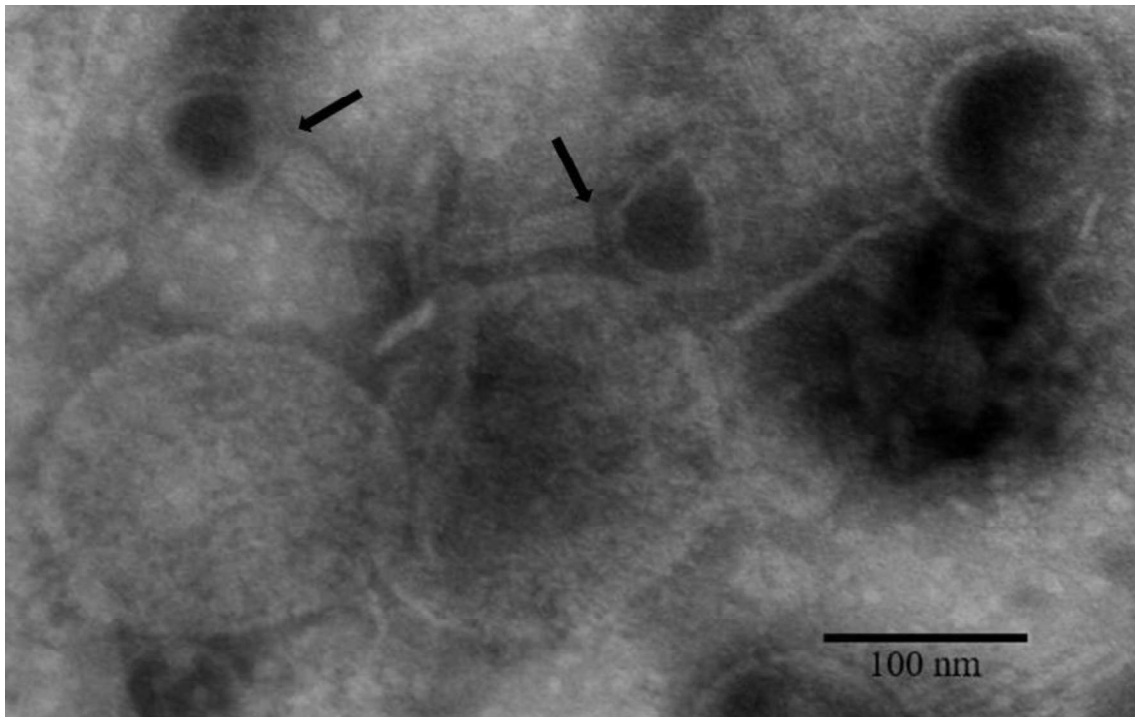
### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 Isolamento e caracterização morfológica dos bacteriófagos C1 e Ent

Após o procedimento de contato das suspensões bacterianas com amostras da rede de esgoto da cidade de Viçosa (Minas Gerais, Brasil), foi possível observar placas de lise visíveis nas culturas de *C. freudii* e *E. cloacae*, referente aos fagos C1 e Ent, respectivamente. Após três rodadas de propagação com o repique de uma única placa de lise, foi possível garantir o isolamento de um único vírus. Após sucessivas propagações líquidas a 37 °C, 180 rpm, por 12 h, os estoques do fago C1 apresentaram um título de  $6,2 \times 10^8$  UFP / mL e o fago Ent o título de  $5,0 \times 10^{11}$  UFP / mL e esses foram usados para todos os ensaios subsequentes.

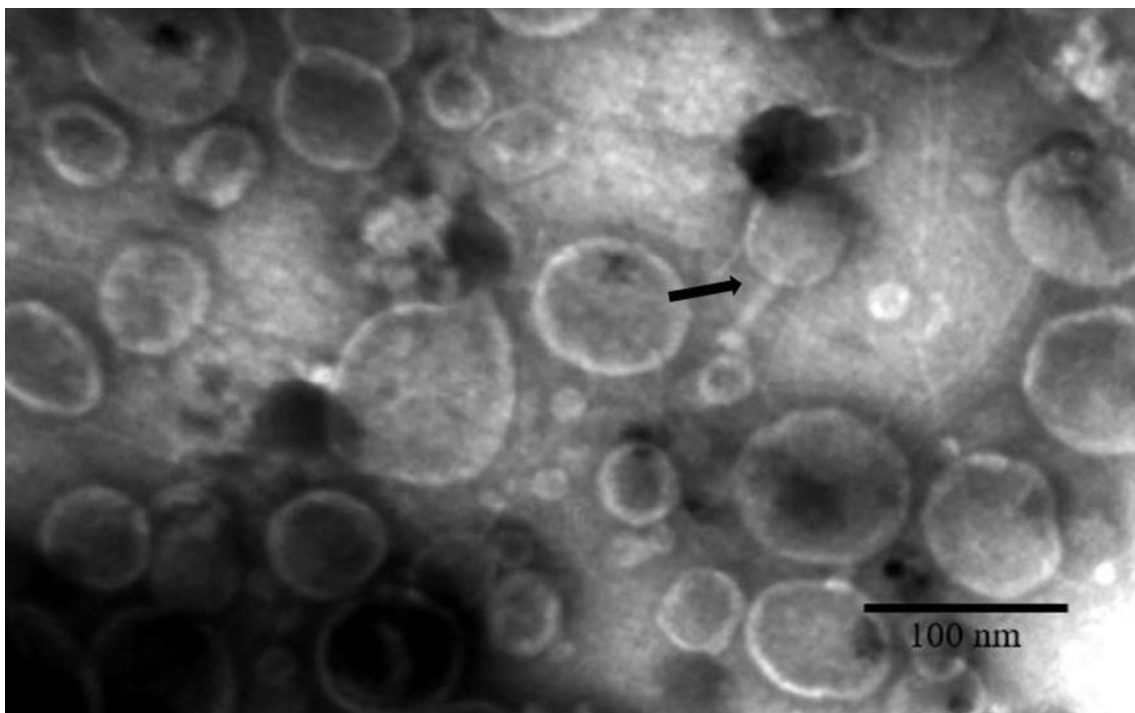
A análise morfológica do fago C1, isolado de *C. freudii*, revela que esse fago pertence à ordem Caudovirales, família Myoviridae, com capsídeo de aproximadamente 65 nm e cauda de aproximadamente 25 nm (Figura 1). Assim como para o fago Ent, isolado de *E. cloacae*, pertencente então a ordem Caudovirales, família Myoviridae, entretanto é de se notar que a qualidade da microscopia foi deficiente, devido a formação de vesículas celulares e artefatos decorrente do preparo das grids de microscopia, que impediram a melhor visualização da partícula viral (Figura 2).

Figura 1 – Microscopia eletrônica de transmissão do bacteriófago vB\_Cfr-UFV1 (C1).



Fonte: A autora

Figura 2 – Microscopia eletrônica de transmissão do bacteriófago vB\_Ecl-UFV1 (Ent).



Fonte: A autora

### 3.3.2 Ensaio de atividade sobre biofilmes

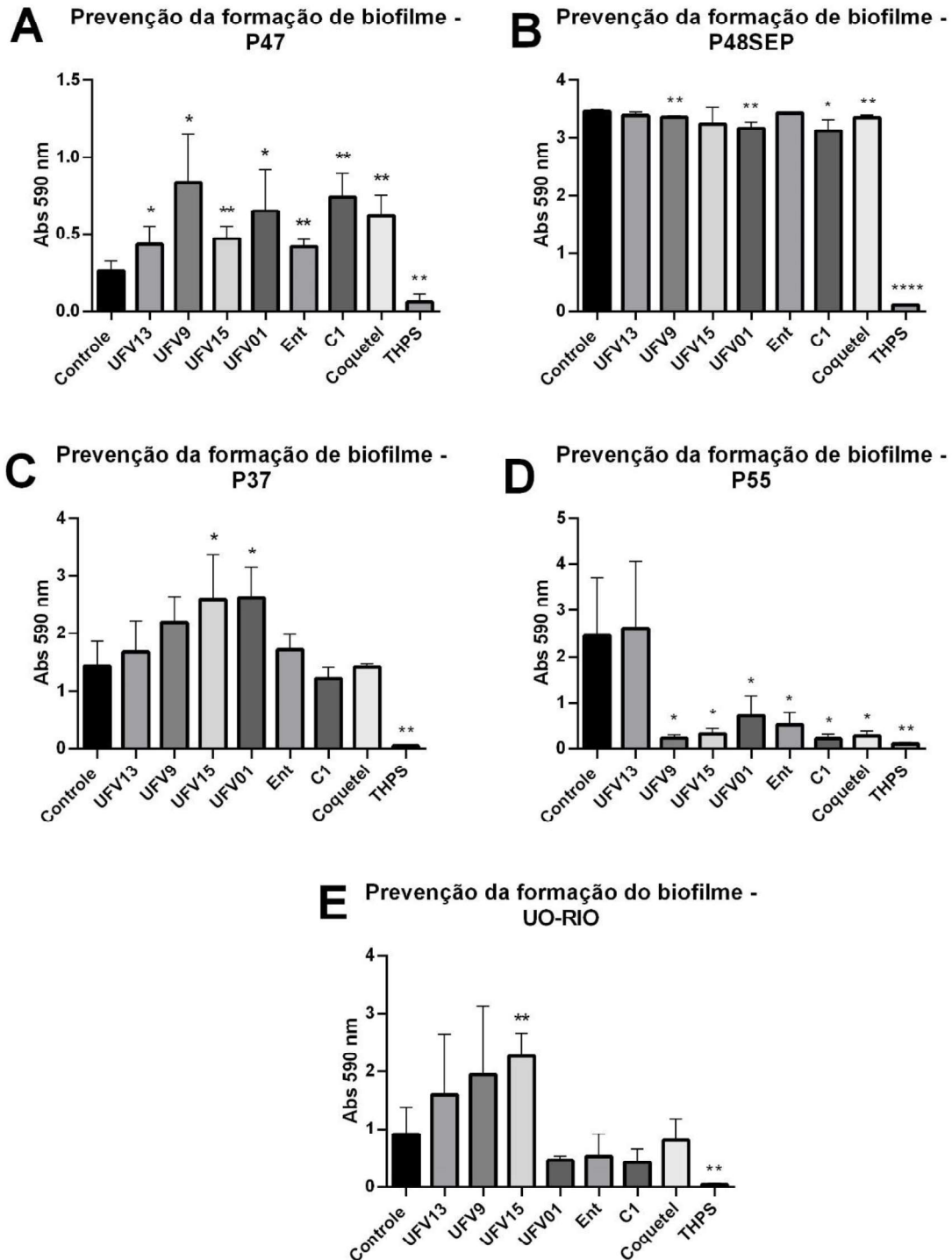
Culturas mistas de BRS, cedidas pela Petrobras e pertencentes a diferentes localidades e cenários petrolíferos foram cultivadas em meio *Postgate E*, modificado sem  $\text{FeSO}_4$ , de modo a não se produzir  $\text{FeS}$ , produto característico do crescimento microbiano (ENNING e GARRELFs, 2014), visto que, por produzirem precipitados ( $\text{FeS}/\text{FeCO}_3$ ), poderiam interferir na análise quantitativa de formação do biofilme. Desse modo, a análise de crescimento microbiano foi realizada por espectrofotometria e vários repiques foram realizados para garantir a atividade das culturas (DO CARMO, 2019).

Foram observadas redução da formação do biofilme pelo coquetel de bacteriófagos proposto em duas culturas testadas e o biocida comercial, THPS, apresentou ação sobre o biofilme de todas as culturas avaliadas.

O coquetel, assim como os fagos isolados, UFV09, UFV15, UFV01, Ent e C1, obtiveram melhor desempenho na prevenção da formação do biofilme da cultura P55, isolada de água de injeção, na Bacia do Espírito Santo (Figura 3D). O fago UFV13 foi o único fago que não impediu a formação do biofilme pela cultura P55.

A cultura P48SEP, isolada do separador de produção, na Bacia de Campos, também sofreu redução da formação do biofilme com a administração do coquetel de bacteriófagos (Figura 3B). Quando isolados, observamos que apenas os fagos UFV9, UFV01 e C1 preveniram a formação biofilme ( $P < 0,05$ ).

Figura 3 – Ensaio de prevenção da formação do biofilme das culturas mistas de plataformas de petróleo na presença dos fagos isolado, coquetel de bacteriófagos e THPS utilizando método de cristal violeta 0,1 %. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$ .

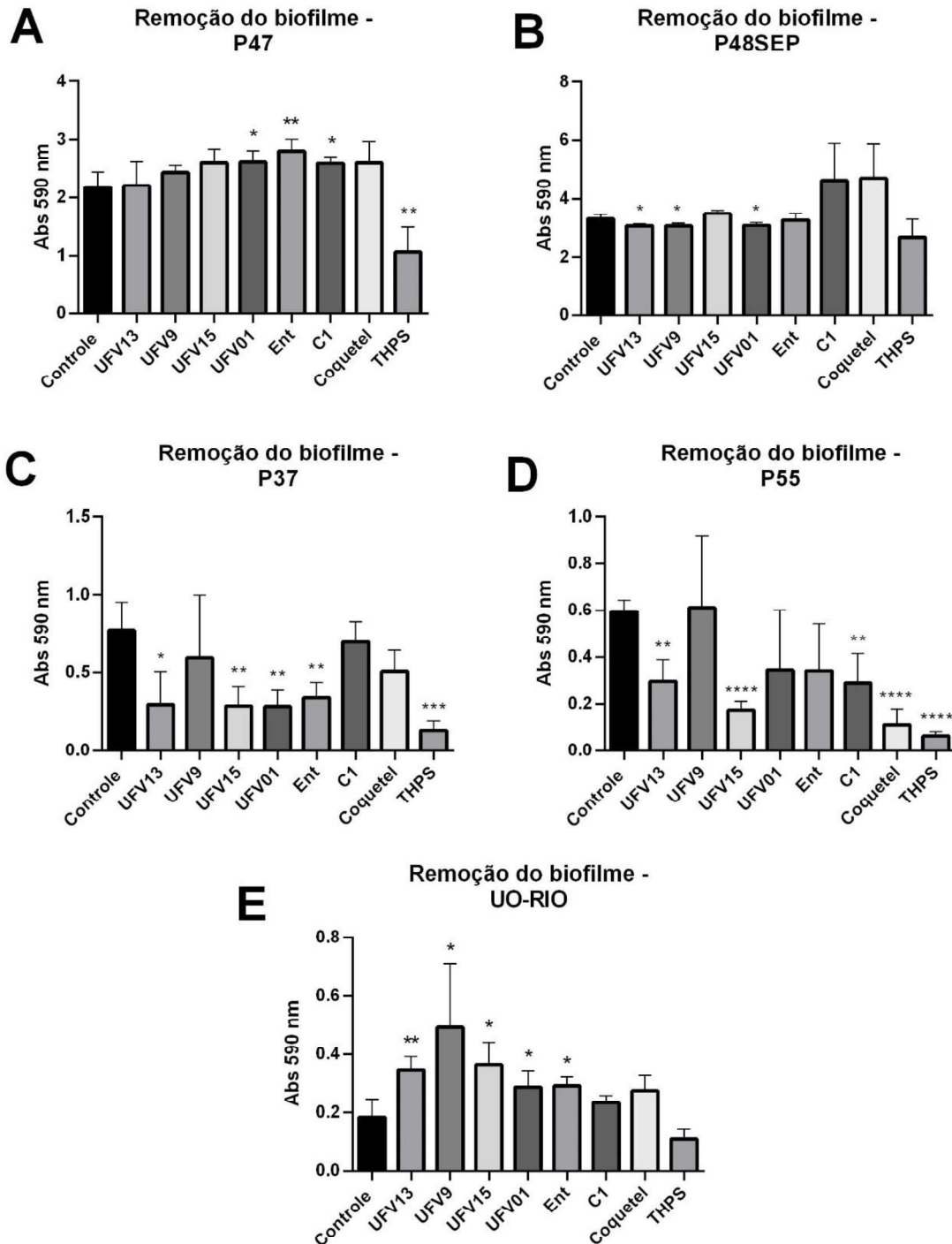


Fonte: A autora

O coquetel de bacteriófagos removeu de forma significativa o biofilme da cultura P55 (água de injeção, Bacia do Espírito Santo), assim como os fagos UFV13, UFV15 e C1, separadamente, e o THPS (Figura 4D). Na cultura P48SEP (separador de produção, Bacia de Campos) foi observada a remoção significativa com a administração dos fagos UFV13, UFV9 e UFV01, isolados. Em contrapartida, o THPS não removeu o biofilme da cultura (Figura 4B). Na cultura P37 (tanque *slop*, Bacia de Campos), não foi observada a remoção do biofilme pelo coquetel de bacteriófagos, mas houve redução significativa com o tratamento com os fagos UFV13, UFV15, UFV01 e Ent, separadamente (Figura 4C).

Os biofilmes formados pela cultura P47 (tanque de armazenamento de petróleo, Bacia de Campos), foram removidos significativamente apenas quando foi administrado o THPS (controle) (Figura 4A), enquanto que os da cultura UO-RIO (água de injeção, Bacia de Santos) não foram desestruturados por nenhum dos tratamentos realizados (Figura 4E).

Figura 4 – Ensaio de remoção do biofilme das culturas mistas de plataformas de petróleo presença dos fagos isolado, coquetel de bacteriófagos e THPS utilizando método de cristal violeta 0,1%. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$ .



Fonte: A autora

Nos ensaios de prevenção da formação do biofilme, podemos observar um aumento significativo do biofilme nas culturas: P47 na administração de todos os fagos inclusive o coquetel (Figura 3A), P37 com os fagos UFV15 e UFV01 (Figura 3C); e UO-RIO com o fago UFV15 (Figura 3E), assim como nos ensaios de remoção do biofilme com as culturas: P47, com os fagos UFV01, Ent e C1, e na cultura UO-RIO nos tratamentos com os fagos UFV13, UFV9, UFV15, UFV01 e Ent (Figura 4E). Em geral, as culturas P47 e UO-RIO tiveram os biofilmes majoritariamente estimulados pela presença dos fagos.

### 3.4 DISCUSSÃO

As bactérias apresentam diferentes mecanismos de proteção contra invasores e alterações ambientais. Para se protegerem contra a infecção por bacteriófagos, elas podem alterar a estrutura do receptor celular do vírus, impedindo, portanto, sua infecção (YANG et al., 2020). Tais vantagens adaptativas das bactérias, podem ser suprimidas devido a co-evolução dos fagos que a infecta. Além disso a utilização de coquetéis fágicos multiespecíficos oferece um abrangência de hospedeiros que podem ser combatidos com o mesmo fago, sendo portanto uma aplicação interessante principalmente porque os microrganismos se encontram em comunidades compostas por múltiplas espécies (ALVES et al., 2016; YANG et al., 2020).

SMITH e HUGGINS (1983) foram os primeiros capazes de antecipar a evolução da resistência da bactéria ao fago, ao usarem uma abordagem de fago duplo limitando o surgimento de bactérias resistentes. A resistência aos bacteriófagos pode, portanto, ser prevenida com a utilização de coquetéis fágicos, não apenas com o intuito de aumentar a probabilidade de infecção a um determinado hospedeiro, pelo reconhecimento de diferentes receptores celulares, mas também de erradicar biofilmes, uma vez que aumenta o potencial enzimático que pode atuar sobre o biofilme de diferentes microrganismos (ALVES et al., 2016; YANG et al., 2020).

Neste trabalho foi proposto um coquetel composto pelos fagos: vB\_EcoM-UFV13, vB\_EcoM-UFV9, vB\_SmaP-UFV01, vB\_Cfr-UFV1, vB\_Ecl-UFV1, vB\_MluM-15. DUARTE e colaboradores (2018) descreveram o bacteriófago vB\_EcoM-UFV13 (UFV13) como um fago T4, isolado de amostras de esgoto, com capacidade de infectar *E. coli* e impedir a formação do biofilme por *T. pyogenes*, uma espécie não relacionada ao seu hospedeiro. A análise genômica do fago UFV13 expressar demonstrou a presença de 8 ORFs que codificam VAPGHs putativas com alto potencial de degradação da matriz extracelular presente nos biofilmes. DO CARMO (2019) demonstrou, ainda, a capacidade do bacteriófago vB\_EcoM-UFV13 em reduzir a formação do biofilme de *D. marinus*, em um consórcio bacteriano, com  $10^8$  UFP/mL e  $10^{12}$  UFP/mL de concentração viral. Estudos do nosso grupo de pesquisa, mostraram a capacidade genética em expressar diferentes enzimas no bacteriófago vB\_SmaP-UFV01 (UFV01) isolado de sistemas de esgoto e que possui *S. marcescens*

como hospedeiro (VIEIRA, 2019), bem como a capacidade de reduzir o biofilme de *E. coli*, *S. liquefaciens* e *P. vulgaris*. O bacteriófago vB\_EcoM\_UFV09 (UFV9), isolado de *E. coli*, apresenta em seu genoma uma ORF que expressa a gp115, uma enzima capaz de degradar o peptidoglicano com atividade de amidase, entretanto indicou por uma análise de similaridade, que essa é uma enzima comum em bacteriófagos de modo geral (DA SILVA, 2019), mas possui a capacidade promissora de infectar diferentes cepas de *E. coli*. Já os bacteriófagos vB\_MluM-UFV15 (UFV15) isolado de *M. luteus*, vB\_Cfr-UFV1 (C1) isolado de *C. freudii* e vB\_Ecl-UFV1 (Ent) isolado de *E. cloacae*, todos também isolados do sistema de esgoto da cidade de Viçosa, MG, apesar de ainda não descrito seu potencial enzimático, foram capazes também de reduzir a formação do biofilme de diferentes enterobactérias (dados não publicados). Tais estudos qualificam os fagos descritos como promissores componentes de coquetéis fágicos no controle do biofilme de diferentes espécies.

O fago UFV01 apesar de ter a capacidade de reduzir a formação do biofilme de enterobactérias (dados não publicados), demonstrou ser de difícil propagação em meio líquido, obtendo título inicial máximo de  $3,2 \times 10^7$  UFP/mL. Desse modo, em todos os ensaios o título final do fago UFV01 nos tratamentos foi de aproximadamente  $1 \times 10^6$  UFP/mL, enquanto todos os fagos foram inoculados com título de  $1 \times 10^7$  UFP/mL. Os fagos de difícil propagação são problemáticos quanto a aplicação, uma vez que dependendo da amostra os títulos desejados para resultados significativos podem não ser alcançados.

Com relação aos resultados dos ensaios de prevenção da formação do biofilme os bacteriófagos selecionados para a formulação do coquetel apresentaram desempenho satisfatório na prevenção da formação do biofilme (Figura 3).

A análise genômica do fago UFV01, confirma o potencial genético de produção de enzimas por parte desse fago, sugerindo que podem ser as responsáveis pela redução do biofilme encontrado (VIEIRA, 2019). Apesar de no genoma do fago UFV9 não terem sido identificadas hidrolases promissoras com acentuado potencial biotecnológico, há indícios de que a amidase do tipo N-acetilmuramoil-L-alanina, presente na cauda do vB\_EcoM\_UFV09, tenha impacto na formação do biofilme bacteriano (DA SILVA, 2019) e, portanto, pode ser a responsável pelo desempenho do fago na prevenção da formação de biofilme.

O fago UFV13 não foi capaz de impedir a formação do biofilme do consórcio P48SEP, como relatado por DO CARMO (2019), que observou que o fago UFV13 foi capaz de prevenir a formação de biofilme desenvolvido pelo consórcio P48SEP, quando administrado em média ( $10^8$  UFP/mL) e alta ( $10^{12}$  UFP/mL) concentração. Entretanto no presente trabalho foi administrado um título final de  $1 \times 10^7$  UFP/mL, tanto no coquetel como para os fagos individualmente, desse modo a concentração utilizada provavelmente não foi suficiente para obter resultados significativos. Além, disso vale ressaltar que no estudo de DO CARMO (2019) o fago UFV13 foi avaliado em consórcio com duas BRS, formado por *Desulfovibrio marinus* e *Oceanotoga teriensis*, e em cupons de aço carbono 1020. No presente trabalho, foram utilizadas culturas mistas de BRS, o que aumenta a complexidade do biofilme formado e a diversidade bacteriana.

O THPS é um biocida amplamente utilizado na indústria de petróleo e gás por ser mais biodegradável, que os outros biocidas, e eficaz contra um amplo espectro de microrganismos (EPA, 1997), por interromper as ligações de dissulfeto entre as proteínas e enzimas, impedindo a atividade microbiana (MARRS e BALLANTYNE, 2003; GREENE et al., 2006; LI et al., 2016). Entretanto o uso contínuo do mesmo biocida, promove inevitavelmente o escalonamento da dosagem, devido à promoção seletiva de microrganismos resistentes ao longo do tempo, se tornando um problema para o setor (LI et al., 2016). Com a produção do biofilme pelas BRS, temos ainda um agravante maior, relata-se a necessidade da concentração de biocida dez vezes maior nos biofilmes, em comparação com o tratamento de células planctônicas (NICKEL et al., 1985). Em algumas operações de campo, a dosagem de THPS é tão alta, de modo que o sulfato introduzido pelo THPS precipita juntamente com outros compostos, causando incrustações problemáticas no fundo de tanques de petróleo, além disso altas doses de biocidas também acarretam preocupações ambientais, além do aumento dos custos (LI et al., 2016). De modo que uma alternativa capaz de reduzir a quantidade de biocida dosada é de grande interesse.

Com relação aos resultados dos ensaios de remoção do biofilme formado, a aplicação fagos apresentou resultados significativos para mais da metade das culturas mistas analisadas (Figura 2B, 2D e 2E). Demonstrando o potencial da aplicação do coquetel de bacteriófagos formulado, no controle do biofilme de culturas mistas de BRS de diferentes cenários petrolíferos.

Nos ensaios de prevenção da formação e remoção do biofilme foi observado também o aumento significativo do mesmo, em algumas culturas, causado pelo tratamento com os fagos. Esse aumento pode ocorrer devido a resíduos presentes na amostra de fagos, uma vez que a suspensão viral utilizada é originada da lise celular do hospedeiro no qual o fago foi propagado, e neste momento muitas bactérias podem liberar endotoxinas, que podem inibir ou eliminar outros organismos presentes na comunidade, assim como podem induzir respostas ao estresse, aumentando a formação do biofilme (BUSRI et al., 2017; REUTER e KRUGER, 2020). Problemas associados a resíduos, podem ser superados com a purificação das suspensões virais por cromatografia de troca iônica, antes dos tratamentos (DUARTE et al., 2018). Além disso, o fato de a amostra UO-RIO ser uma mistura de águas de injeção de várias plataformas, pode significar uma alta diversidade microbiana, à qual os fagos utilizados no coquetel multiespecífico não conseguiram agir eficientemente, deste modo, novos fagos e novas formulações de coquetel podem ser realizadas para a cultura OU-RIO. Do mesmo modo, considerando que as culturas mistas testadas foram obtidas de diferentes cenários petrolíferos, essa diversidade entre as amostras é esperada, o que justifica os resultados diferentes obtidos. Dessa forma, análise da composição das culturas é de grande interesse uma vez que é possível otimizar a formulações de coquetéis fágicos de acordo com o padrão de cultura encontrado em cada setor (YANG et al., 2020).

De acordo com os dados obtidos nesse trabalho, acreditamos que um novo coquetel possa ser formulado com os fagos UFV15, UFV01 e Ent, visto que foram os fagos que obtiveram de modo geral os melhores resultados para a prevenir e remover o biofilme das culturas mistas analisadas, além disso novos coquetéis podem ser formulados e investigados de modo a otimizar sua aplicação. Além disso a caracterização genética desses fagos é almejada, parainvestigar a presença de enzimas, fatores de patogenicidade ou de transferência de genes, com o objetivo de obter fagos com melhores desempenhos para o biocontrole dessas culturas. A caracterização microbiana das amostras testadas também é de grande interesse. Além disso ensaios com diferentes modelos de biofilme devem ser realizados, como biofilmes dinâmicos, corroborando com o estudo de ALVES e colaboradores (2016), uma vez que a expressão de polissacarídeos, a sinalização celular e a resistência ao estresse, são fortemente afetadas pelas condições do ambiente à qual os organismos

se encontram, sendo portanto o sucesso da aplicação dependente desses parâmetros. Dessa forma, ensaios que melhor representam as condições encontradas pelos microrganismos, apresentam dados mais representativos (ALVES et al., 2016).

O fato de os fagos líticos matarem as células bacterianas por mecanismos totalmente diferente dos biocidas, revela o potencial da aplicação dos fagos combinada a esses compostos, uma vez que por codificarem enzimas que podem degradar o biofilme, permitem o acesso dos biocidas aos microrganismos dentro do biofilme (NIKOLICH e FILIPPOV, 2020). O efeito sinérgico de diferentes biocidas com proporções variadas de sulfato de cobre, foi avaliado com objetivo de eliminar as BRS (AIAD et al., 2014), assim como o sinergismos de biocidas e nitrato para o controle de acidificação do petróleo (XUE e VOORDOUW, 2015). O efeito sinérgico de fagos com antibióticos já foi também estudado para o controle de bactérias multidroga resistente (FUENTES et al., 2014; MORADPOUR et al., 2020). Desse modo, pode ser avaliado também o sinergismo do biocida, THPS, com o coquetel de bacteriófagos, principalmente com o objetivo de remover o biofilme previamente formado, visto que o THPS não foi capaz de atuar na maior parte dos biofilmes testados, e o fago pode auxiliar na remoção do biofilme, derrubando essa barreira física, e permitir, portanto, o acesso aos microrganismos na comunidade pelo biocida.

### 3.5 CONCLUSÃO

Bacteriófagos podem ser uma alternativa promissora na mitigação do biofilme de BRS em diferentes cenários da indústria de petróleo. O coquetel formado pelos bacteriófagos UFV13, UFV9, UFV15, UFV01, C1 e Ent, assim como os fagos separadamente, influenciaram de forma diferente cada uma das culturas mistas de BRS utilizadas nos ensaios. Considerando que são culturas mistas de setores e localidades diferentes, e que ainda não foi avaliada a composição bacteriana de cada uma delas, os resultados são condizentes com a literatura. Os dados obtidos de redução da formação do biofilme da cultura P55 e P48SEP, assim como os de remoção das culturas P48SEP, P55 e P37 são animadores, confirmando o potencial dos fagos no controle do biofilme, apesar de necessária a otimização da metodologia.

### 3.6 REFERÊNCIAS

ABRÀMOFFF, M. D.; MAGALHÃES, P. J.; RAM, S. J. Image processing with ImageJ Part II. **Biophotonics International**, v. 11, n. 7, 2005.

AGÊNCIA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL DOS ESTADOS UNIDOS. **THPS Biocides: A New Class of Antimicrobial Chemistry Prêmio Designing Greener Chemicals de 1997**, 1997. Disponível em: <<https://www.epa.gov/greenchemistry/presidential-green-chemistry-challenge-1997-designing-greener-chemicals-award>>

AIAD, I. et al. Synergistic Effect of Copper Sulfate with some Traditional Biocides for Killing the Sulfate Reducing Bacteria in Oil Fields. **Middle East Journal of Applied Sciences**, v. 4, n. 2, p. 373–384, 2014.

ALVES, D. R. et al. A novel bacteriophage cocktail reduces and disperses *Pseudomonas aeruginosa* biofilms under static and flow conditions. **Microbial Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 61–74, 1 jan. 2016.

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, 1 out. 2014.

BHAT, S.; KUMAR, BIPIN; PRASAD, S. R.; KATARKI, M. V. Failure of a new 8-in pipeline from group gathering station to central tank farm. **Materials Performance**, v. 50, n. 5, p. 50–54, 2011.

BLACKWOOD, D. An Electrochemist Perspective of Microbiologically Influenced Corrosion. **Corrosion and Materials Degradation**, v. 1, n. 1, p. 59–76, 2018.

BOURDIN, G. et al. Amplification and purification of T4-Like *Escherichia coli* phages for phage therapy: From laboratory to pilot scale. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 4, p. 1469–1476, 2014.

BUSRI, A.; PUSPITAWATI, R.; UTAMI, S. Antibacterial effect of java turmeric ethanol extract against dual-species *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* biofilm (In vitro). **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 10, n. Special Issue October, p. 57–60, 1 out. 2017.

CAVALCANTI, G. D. H. **Efeito de biocidas sobre biofilmes bacterianos envolvidos em processos de biocorrosão em plataformas marítimas da Petrobras.** [s.l.] Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, p.142, 2001.

DA SILVA DUARTE, V. et al. A T4virus prevents biofilm formation by *Trueperella pyogenes*. **Veterinary Microbiology**, v. 218, p. 45–51, 1 maio 2018.

DA SILVA, J. D. **Caracterização e otimização da produção do bacteriófago lítico vB\_EcoM\_UFV09.** [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2019.

DE SOUSA, K. A.; CAMMAROTA, M. C.; CAMPORESE, E. F. S. Efeito da aplicação de nitrato na redução biogênica de sulfeto sob diferentes concentrações iniciais de bactérias redutoras de nitrato e sulfato. **Quimica Nova**, v. 33, n. 2, p. 273–278, 2010.

DO CARMO, A. J. **Influência do fago vB\_EcoM-UFV13 no biofilme formado pelo consórcio P48SEP.** [s.l.] Dissertação (mestrado) - Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2019.

DUARTE, V. S.; DIAS, R. S.; KROPINSKI, A. M. .; XAVIER, A. S.; FERRO, C. G.; VIDIGAL, P. M. P.; SILVA, C. C.; DE PAULA, S. O. A T4virus prevents biofilm formation by *Trueperella pyogenes*. **Veterinary Microbiology**, v. 218, n. 2, p. 45–51, 2018.

DUARTE, V. S. et al. Complete genome sequence of vB\_EcoM-UFV13, a new bacteriophage able to disrupt *Trueperella pyogenes* biofilm. **Genome Announcements**, v. 4, n. 6, 29 dez. 2016.

ENNING, D.; GARRELF, J. Corrosion of iron by sulfate-reducing bacteria: New views of an old problem. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 4, p. 1226–1236, 2014.

FUENTES, M. A. F. et al. Synergistic activity of biocides and antibiotics on resistant bacteria from organically produced foods. **Microbial Drug Resistance**, v. 20, n. 5, p. 383–391, 1 out. 2014.

GREENE, E. A.; BRUNELLE, V.; JENNEMAN, G. E.; VOORDOUW, G. Synergistic inhibition of microbial sulfide production by combinations of the metabolic inhibitor nitrite and biocides. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 12, p. 7897–

7901, 2006.

HINKSON, D.; WHEELER, C.; ONEY, C.; KEASLER, V. **MIC in a CO<sub>2</sub> gathering line? A field case study of microbiologically influenced corrosion**. NACE - International Corrosion Conference Series. **Anais...**2013

J. SAMBROOK I D. W. RUSSELL. **Molecular cloning : a laboratory manual, III**. 3rd ed. ed. [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

JACOBSON, G. A. Corrosion at Prudhoe Bay - A lesson on the line. **Materials Performance**, v. 48, n. 8, p. 26–34, 2007.

JIA, R.; UNSAL, T.; XU, D.; LEKBACH, Y.; GU, T. Microbiologically influenced corrosion and current mitigation strategies: A state of the art review. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 137, p. 42–58, 2019.

LAHME, S.; ENNING, D.; CALLBECK, C. M.; VEGA, D. M. .; CURTIS, T. P.; HEAD, I. M. .; HUBERT, C. R. J. Metabolites of an oil field sulfideoxidizing, nitrate-reducing *Sulfurimonas* sp. cause severe corrosion. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 3, p. 12, 2019.

LI, Y.; JIA, R.; AL-MAHAMEDH, H. H.; XU, D.; GU, T. Enhanced biocide mitigation of field biofilm consortia by a mixture of D-amino acids. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 896, p. 13, 2016.

LI, Y.; XU, D.; CHEN, C.; LI, X.; JIA, R.; ZHANG, D.; SAND, W.; WANG, F.; GU, T. Anaerobic microbiologically influenced corrosion mechanisms interpreted using bioenergetics and bioelectrochemistry: A review. **Journal of Materials Science and Technology**, v. 34, n. 10, p. 1713–1718, 2018.

LITTLE, B.J.; BLACKWOOD, D.J.; HINKS, J.; LAURO, F.M.; MARSILI, E.; OKAMOTO, A.; RICE, S.A.; WADE, S.A.; FLEMMING, H. C. Microbially influenced corrosion – any progress? **Corrosion Science**, v. 170, n. 108641, p. 17, 2020.

LV, M.; DU, M. A review: microbiologically influenced corrosion and the effect of cathodic polarization on typical bacteria. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 17, p. 331–346, 2018.

MARRS, T. C.; BALLANTYNE, B. **Pesticide Toxicology and International Regulation**. [s.l.] Wiley, 2003.

MORADPOUR, Z. et al. Synergistic bactericidal activity of a naturally isolated phage and ampicillin against urinary tract infecting *Escherichia coli* O157. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 23, n. 2, p. 257–263, 2020.

NICKEL, J. C. et al. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 27, n. 4, p. 619–624, 1985.

NIKOLICH, M. P.; FILIPPOV, A. A. **Bacteriophage therapy: Developments and directions** *Antibiotics* MDPI AG, , 1 mar. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32148498/>. Acesso em: 7 jun. 2021

POSTGATE, J. R. The Sulfate-Reducing Bacteria. **Journal of Basic Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 202–202, 1 jan. 1984.

REUTER, M.; KRUGER, D. H. **Approaches to optimize therapeutic bacteriophage and bacteriophage-derived products to combat bacterial infections** *Virus Genes* Springer, , 1 abr. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3223754/>. Acesso em: 7 jun. 2021

ROSS, A.; WARD, S.; HYMAN, P. More is better: Selecting for broad host range bacteriophages. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. SEP, 2016.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. **NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis** *Nature Methods*, 2012.

SUMMER, ELIZABETH J.; LIU, MEI; SUMMER, NEIL S.; BALDWIN, D. **Prevention and Remediation of Petroleum Reservoir Souring and Corrosion by Treatment with Virulent Bacteriophage**, 2017. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/US9650272B2/en>

SUMMER, N. S. .; SUMMER, ELIZABETH J.; GILL, JASON; YOUNG, R. **Phage Remediation of Microbe Induced Corrosion**. 17th International Corrosion Congresso. **Anais...** Las Vegas, Nevada: 2008 Disponível em: <https://nace.confex.com/nace/ICC08/webprogram/Paper3343.html>. Acesso em: 9 jun. 2021

VIEIRA, M. S. **Isolamento e caracterização do bacteriófago vB\_SmaP\_UFV01 específico para *Serratia marcescens* e avaliação do seu potencial na redução de**

**biofilmes bacterianos.** [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2019.

WILLIAMS SMITH, H.; HUGGINS, M. B. Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs. **Journal of General Microbiology**, v. 129, n. 8, p. 2659–2675, 1983.

XUE, Y.; VOORDOUW, G. Control of microbial sulfide production with biocides and nitrate in oil reservoir simulating bioreactors. **Frontiers in Microbiology**, 2015.

YANG, Y. et al. Development of a Bacteriophage Cocktail to Constrain the Emergence of Phage-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 327, 4 mar. 2020.

YUK, S. K.; AZAM, A. H.; MIYANAGA, K.; TANJI, Y. The contribution of nitrate-reducing bacterium *Marinobacter* YB03 to biological souring and microbiologically influenced corrosion of carbon steel. **Biochemical Engineering Journal**, v. 156, p. 1–27, 2020.

## **4. CAPÍTULO 2: ATIVIDADE DE UMA PEPTIDEOGLICANO-HIDROLASE ASSOCIADA A VIRION (VAPGH) RECOMBINANTE DO BACTERIÓFAGO vB\_EcoM-UFV13 NO CONTROLE DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Escherichia coli***

### **4.1 INTRODUÇÃO**

O biofilme é composto por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares e células sésseis incorporadas, formando uma comunidade complexa (PEI e LAMAS-SAMANAMUD, 2014). O biofilme apresenta uma grande vantagem adaptativa aos microrganismos ali presentes, como proteção contra perturbações ambientais, resistência a biocidas, além de fornecer condições favoráveis ao seu desenvolvimento, devido ao sinergismo entre os microrganismos presentes na comunidade (FLEMMING e WINGENDER, 2010; GARRETT et al., 2008).

Embora o biofilme seja vantajoso para a comunidade microbiana, ele é considerado um dos grandes problemas em diversas áreas, exatamente devido à dificuldade de atuação de antimicrobianos e desinfetantes, para a remoção completa dos microrganismos, podendo acarretar infecções crônicas na clínica e na área industrial grandes perdas econômicas (GARRETT et al., 2008). Desse modo, diferentes abordagens são utilizadas e estudadas impedir a formação e remoção do biofilme em diferentes setores (AKANDA et al., 2018; GARRETT et al., 2008; GUTIÉRREZ et al., 2016; SOUSA e MENDES, 2014).

Peptideoglicano-hidrolases são enzimas que atuam degradando o peptideoglicano, dentre elas temos as endolisinas e as VAPGHs. Tem sido demonstrado que as endolisinas e as VAPGHs, possuem atividade lítica contra diferentes espécies bacterianas (YANG et al., 2018) e efeito sobre biofilmes (DUARTE et al., 2018; GUTIÉRREZ et al., 2014). VAPGHs são proteínas estruturais dos bacteriófagos, que possuem domínio enzimático responsável clivagem do peptideoglicano do hospedeiro, permitindo a infecção do fago (NISHIMA et al., 2011).

Além disso, esses domínios catalíticos podem atuar desestruturando o biofilme de espécies não relacionadas, mostrando o potencial biotecnológico da aplicação de

enzimas fágicas. Apesar de amplamente identificados no genoma de muitos bacteriófagos, pouco se é conhecido sobre o potencial e atividade de VAPGH recombinantes sobre os biofilmes bacteriano (RODRÍGUEZ-RUBIO et al., 2013).

A ORF 246 (vBEcoMUFV13\_g246) do bacteriófago vB\_EcoM-UFV13 (UFV13), identificada por DUARTE e colaboradores (2016), apresenta oito domínio de hidrolases, dentre eles a 246 com categorização funcional de N-acetil-anhidromuramyl-alanina amidase. A sequência da ORF246 demonstrou homologia com a Gp37, uma proteína estrutural pertencente a fibra da cauda longa de fagos T4, grupo a qual o fago UFV13 pertence, deste modo reafirmando a hipótese de que a proteína 246 pode ser considerada uma VAPGH, e deste modo hidrolisar o peptidoglicano e desestruturar biofilmes. O objetivo deste trabalho então, foi avaliar o potencial da peptidoglicano-hidrolase associada a vírion 246 codificada pelo bacteriófago vB\_EcoM-UFV13, expressa em sistema procarioto, em reduzir a formação do biofilme de *Escherichia coli*, visando aplicação em culturas mistas de bactérias redutoras de sulfato.

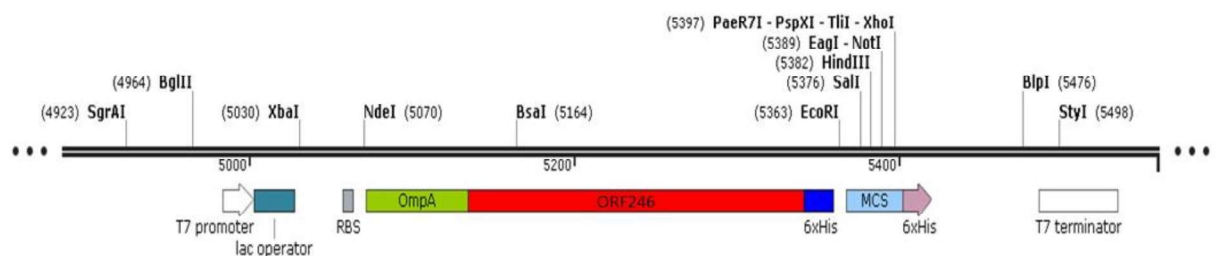
## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Construção do vetor de expressão

A sequência da VAPGH, codificada pela ORF246, possuindo 1286 aminoácidos, foi obtida a partir do genoma do bacteriófago vB\_EcoM-UFV13 (UFV13), depositado no GenBank sob o número de acesso [KU867876](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KU867876) (DUARTE et al., 2016; 2018).

Os vetores contendo a sequência da ORF 246 foram obtidos comercialmente (GenOne Biotechnologies, Brasil), construídos em vetor expressão pET24a+ com marca de seleção para Canamicina, e otimizados para a expressão em *E. coli* BL21 (DE3). A configuração do plasmídeo ocorreu de acordo com a representação gráfica abaixo (Figura 1). A sequência da VAPGH, de tamanho 3951 pb, é flanqueada pelo peptídeo sinal OmpA, de endereçamento para o periplasma; uma tag de histidina (6xhist); e os sítios de restrição das enzimas *NdeI* (CATATG) e *EcoRI* (GAATTC).

Figura 1. Representação esquemática do inserto no vetor de expressão pET24a+. Representação gráfica utilizado o software SnapGene®.



Fonte: A autora

### 4.2.2 Transformação em célula competente

O plasmídeo contendo a sequência da VAPGH foi inserido em células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) (Sigma-Aldrich, EUA) pelo método de transformação via choque-térmico (SAMBROOK e RUSSELL, 2001). Brevemente, 0,5

$\mu\text{L}$  de uma suspensão contendo plasmídeo a  $50 \mu\text{g/mL}$ , foram adicionadas a  $50 \mu\text{L}$  de célula de *E. coli* BL21 (DE3) competente e a mistura foi incubada sequencialmente por 30 min no gelo, 30 s a  $42^\circ\text{C}$  e 5 min no gelo. E então,  $150 \mu\text{L}$  de meio LB (Luria Bertani) suplementado com 5% de glicose foram adicionados à mistura a qual foi incubada a  $30^\circ\text{C}$  por 60 min a 200 rpm. Posteriormente,  $200 \mu\text{L}$  da amostra foram vertidos em placas de Petri contendo 20 mL de LB sólido, suplementado com  $50 \mu\text{L/mL}$  de Canamicina. As placas foram incubadas a  $30^\circ\text{C}$ , durante a noite.

Posteriormente foi realizada a seleção de colônias de *E. coli* transformantes, na qual as colônias que se desenvolveram no meio seletivo foram inoculadas em 10 mL de meio LB acrescido de Canamicina ( $50 \mu\text{L/mL}$ ) e incubadas a  $30^\circ\text{C}$  por 18 h, a 180 rpm. Aproximadamente 5 mL da suspensão foi destinada à extração de DNA plasmidial para confirmar a transformação bacteriana, e o restante armazenado em glicerol 50% (v/v) a  $-80^\circ\text{C}$ .

#### 4.2.3 Extração de DNA plasmidial

A extração de DNA plasmidial foi realizada conforme o procedimento por lise alcalina (BIMBOIM e DOLY, 1979).

Resumidamente, as células foram sedimentadas por centrifugação a  $10.000 \times g$  por 2 min e o precipitado suspenso em  $200 \mu\text{L}$  da Solução I (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM). Em seguida, foi adicionado  $360 \mu\text{L}$  da Solução II (NaOH 2M, SDS 10%) e a mistura incubada à temperatura ambiente por 5 min. Após incubação, foi adicionada a solução III (acetato de potássio 5 M, 11,5% de ácido acético) e a mistura centrifugada a  $10.000 \times g$  por 10 min. O sobrenadante foi então coletado, e  $750 \mu\text{L}$  de isopropanol foram adicionados ao sobrenadante. A mistura foi incubada a  $-20^\circ\text{C}$  por 5 min. Após incubação, a mistura foi centrifugada ( $10.000 \times g$ , por 10 min) e o precipitado contendo o DNA plasmidial submetido a sucessivas lavagens com etanol 70 %. Os tubos contendo o DNA plasmidial foram secos à temperatura ambiente e o precipitado suspenso em  $30 \mu\text{L}$  de água ultrapura.

A extração de DNA plasmidial foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1,0% (m/v), corados com brometo de etídio (0,01  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) e visualizado no transiluminador com luz ultravioleta.

#### 4.2.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para confirmação da presença dos insertos, foram realizadas Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando GoTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase (Promega, EUA). Os *primers* utilizados para a amplificação foram 5'- CTGTTGGGCCTGTTGTA ACT – 3' (*Forward*) e 5' – CTTAATGCGTCAGCTGTTCC – 3' (*Reverse*), desenhados utilizando o programa *primer3* (v. 0.4.0) (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) e sintetizados pela empresa Síntese Biotecnologia (Brasil).

Para compor a reação de PCR, foram adicionados em microtubos: 2  $\mu\text{L}$  de DNA plasmidial, 1,0  $\mu\text{L}$  de cada *primer* (10 mM), 4  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  25 mM, 1  $\mu\text{L}$  de dNTP (10 mM), 10  $\mu\text{L}$  de Tampão GoTaq e 0,25  $\mu\text{L}$  de GoTaq, sendo o volume completado para 50,0  $\mu\text{L}$  com água deionizada e autoclavada. A reação de PCR foi realizada no termociclador (Applied Biosystems, EUA) nas seguintes condições: uma desnaturação inicial de 5 min a 95 °C, 1 único ciclo; 1 min a 95 °C, 25 s a 55 °C, 1 min a 72 °C por 30 ciclos; e um ciclo final de 5 min a 72 °C.

Os produtos de PCR foram confirmados por eletroforese em gel de agarose a 1,0% (m/v), corados com brometo de etídio (0,01  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) e visualizado por luz ultravioleta.

#### 4.2.5 Expressão da proteína recombinante

Para a expressão da proteína recombinante, uma colônia transformada, foi inoculada em 10 mL de meio LB líquido acrescido de 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de Canamicina e incubada a 30 °C por 16 h, sob agitação de 180 rpm (pré-inóculo). Esse pré-inóculo foi adicionado em 500 mL de meio LB líquido com 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de Canamicina e incubado à 30 °C, sob agitação de 180 rpm até atingir  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  0,7. Em seguida, o indutor IPTG

(isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo) foi adicionado na concentração de 0,5 mM, assim como um novo meio de cultura na proporção (1:10) e a suspensão incubada a 30°C, 180 rpm, por 20h (MEISSNER, 2012; VUITIKA, 2012). *E. coli* BL21 sem ser transformada, foi submetida a todo o processo, incluindo a indução com IPTG, para controle da expressão.

Ao atingir a fase exponencial de crescimento, a suspensão foi centrifugada a 10.000 x g, 4 °C, por 30 min e o precipitado foi recuperado para a separação das frações solúvel e insolúvel. O precipitado foi suspenso em 30 mL tampão A (20 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM de NaCl e 20 mM de imidazol) no gelo, seguido da adição de 300  $\mu$ L de lizozima e sonicação, para rompimento das células, com amplitude de 30 %, 10 s OFF e 20 s ON, por 10 min (AGARWAL; TRIVEDI; MITRA, 2020). As amostras foram centrifugadas (10.000 x g, 4°C, por 30 min) e o sobrenadante coletado como fração solúvel. O novo precipitado formado foi suspenso em tampão A com 6 M de ureia e separado como fração insolúvel.

#### 4.2.6 Purificação da proteína

As frações de proteína, da expressão da ORF 246 e do controle, foram diluídas 5 vezes, filtradas em membrada de 0,45  $\mu$ m e purificadas por cromatografia de afinidade com uma matriz de gel de agarose Ni-NTA (*His-Select Nickel Affinity Gel* - Sigma-Aldrich, EUA) segundo recomendações do fabricante, utilizando o tampão A para a lavagem da coluna e tampão B (20 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM de NaCl e 400 mM de imidazol) para eluição da proteína, com um fluxo de 0,5 mL/min.

Uma alíquota das frações de cada purificação da proteína foi concentrada em Amicon® de 10 kDa, usado também para substituir o tampão, retirando o imidazol da amostra. Em seguida, o sistema foi centrifugado a 4.500 rpm em centrífuga 5804R (Eppendorf®, Alemanha), com rotor móvel, a 4 °C até passagem completa da solução, seguida de recuperação do precipitado com 1 mL de tampão fosfato-salino, PBS 1x (0,22 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,20 g NaHPO<sub>4</sub>, 8,5 g de NaCl). Por fim, a quantificação das proteínas totais foi realizada usando o kit Qubit™ Protein Assay (Thermo Scientific,

EUA) e a medição foi realizada com um fluorímetro, Qubit 4 Fluorometer (Thermo Scientific, EUA).

#### 4.2.7 Avaliação da expressão das proteínas recombinantes

A avaliação da expressão da proteína foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) seguido de Western blotting.

As amostras purificadas foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) 10% e lavadas 3 vezes com acetona 100%. O precipitado foi então suspenso em água e as amostras foram preparadas com tampão desnaturante 1x (50 mM Tris-HCl, 100 mM DTT, 2 % m/v SDS, 0,1 % m/v azul de bromofenol, 10 % v/v glicerol, pH 6.8) e desnaturadas a 95 °C por 10 min, para aplicação no gel de poliacrilamida (AGARWAL; TRIVEDI; MITRA, 2020). Após eletroforese, o gel foi revelado com a solução de Coomassie® Azul brilhante G-250 (Sigma-Aldrich, EUA), para visualização das bandas.

#### 4.2.8 Western blotting

Para confirmar a expressão da proteína recombinante foi realizado o Western blotting. As amostras solúveis, purificada e sem purificar, e as amostras insolúveis foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (assim como descrito no item 4.2.7) e transferidas para uma membrana de nitrocelulose de 0,45 µm usando o equipamento Mini Tras-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, EUA). A membrana foi bloqueada com BSA 3% em PBS-T (0,22 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,20 g NaHPO<sub>4</sub>, 8,5 g de NaCl, 500 µL de Tween 20) por 1 h. Em seguida a membrana foi incubada com anticorpo primário anti-histidina produzido em camundongo diluído 1:3000, durante a noite. Após a incubação com o anticorpo primário, sucessivas lavagens da membrana com PBS-T foram realizadas e em seguida a membrana foi incubada com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com a enzima peroxidase diluída 1:20.000, por 2 h. Após a incubação com o anticorpo secundário,

a membrana foi novamente lavada e então revelada com DAB 1% (15 mL de Tris 50 mM, 15 mg de DAB e 15  $\mu$ L de água oxigenada) (AGARWAL; TRIVEDI; MITRA, 2020).

#### 4.2.9 Atividade da enzima sobre a formação de biofilme

O ensaio foi realizado com *E. coli* 30, hospedeiro do fago vB\_EcoM-UFV13. A cultura de *E. coli* foi cultivada em meio LB a 37 °C, 180 rpm, até atingir DO<sub>600nm</sub> 0,1. Alíquotas de 150  $\mu$ L da suspensão foram inoculadas em cada poço da placa de micro titulação com 50  $\mu$ L do tratamento., fosse ele (1) controle com PBS 1x, (2) fago UFV 13 no título de  $1 \times 10^5$  UFP/mL, (3) fração solúvel da BL21 purificada por cromatografia de afinidade e concentrada na Amicon, ou (4) fração solúvel da enzima 246 purificada por cromatografia de afinidade e concentrada na Amicon. A placa foi incubada a 37 °C por 24 h, seguido da quantificação do biofilme pelo método padrão de cristal violeta 0,1 % (m/v), utilizando o espectrofotômetro Multiskan™ GO (Thermo Scientific, EUA) a 590 nm (DUARTE et al., 2018).

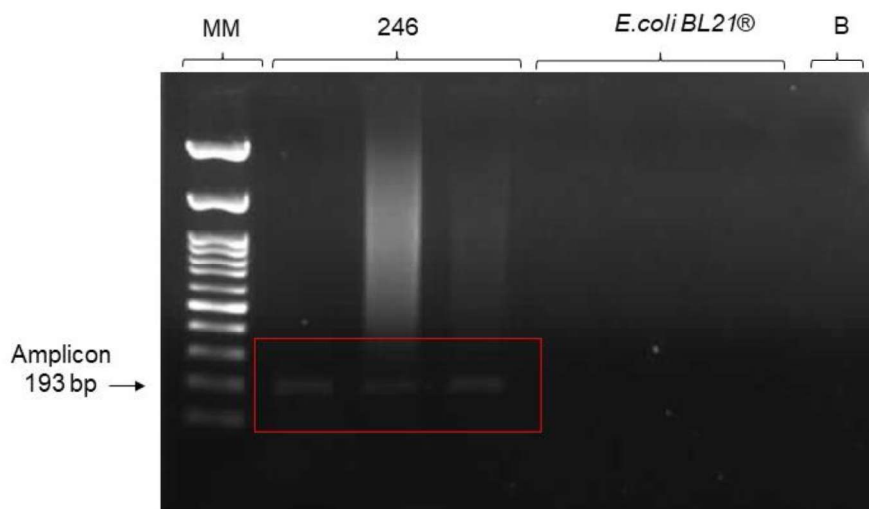
Resumidamente, para a quantificação do biofilme, o meio foi descartado e os poços lavados três vezes com tampão PBS 1x, para remover células não aderidas. As células aderentes foram secas em estufa (aproximadamente 60°C) e fixadas com metanol 99% por 15 min, seguida a remoção e secagem do metanol. O biofilme foi então corado com uma solução de cristal violeta 0,1% (p/v) por 15 min à temperatura ambiente. Posteriormente, os poços foram lavados com tampão fosfato-salino para retirada do excesso de corante. Com os poços devidamente secos, o corante aderido foi solubilizado em 250  $\mu$ L de etanol-acetona 80:20 (v/v) e, após 30 min de incubação a temperatura ambiente, foi realizada a leitura da absorbância à 590 nm por espectrofotometria (DUARTE et al., 2018).

### 4.3 RESULTADOS

#### 4.3.1 Expressão da proteína recombinante

A transformação da *E. coli* BL21(DE3) com o plasmídeo contendo o gene codificador da enzima 246 (ORF246) foi confirmada por PCR (Figura 1). Um fragmento de 193 pb foi visualizado, a partir da reação de PCR com o DNA plasmidial referente à enzima 246 de diferentes clones, o que não foi visualizado no controle da *E. coli* BL21 não transformada, nem no branco da reação de PCR (sem amostra de DNA).

Figura 2. Confirmação da transformação da *E. coli* BL21(DE3) com o plasmídeo codificando a enzima 246. MM: marcador molecular; 246: reação com o DNA plasmidial da bactéria transformada; *E. coli* BL21: reação com o DNA plasmidial da bactéria não transformada; B: branco da reação de PCR

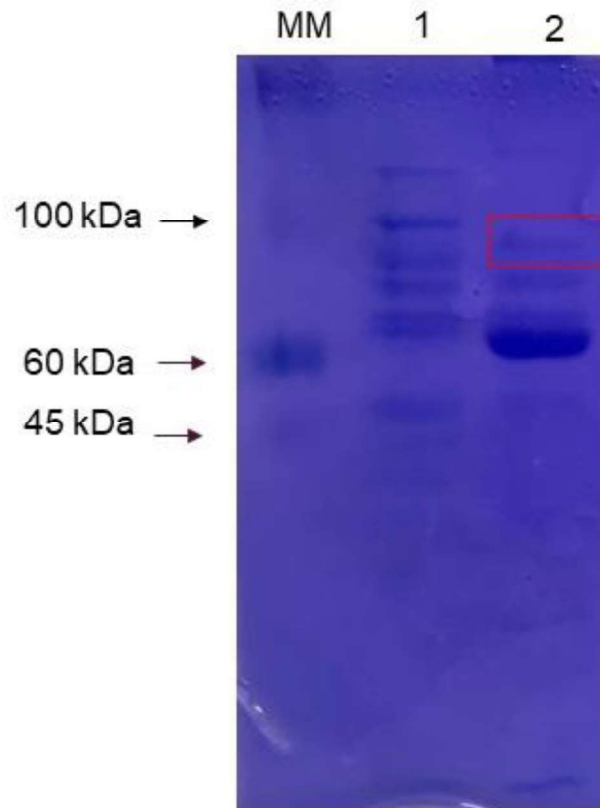


Fonte: A autora

A proteína recombinante foi obtida pela indução da expressão da *E. coli* BL21 (DE3) com 0,5 mM de IPTG por 20 h. A expressão da enzima foi confirmada na fração solúvel da proteína 246 purificada por cromatografia de afinidade (His-tag). Todas as frações da expressão da proteína: solúvel, insolúvel, purificada e não purificada foram precipitadas com TCA 10% e avaliadas por SDS-PAGE (Figura 3) e Western blotting

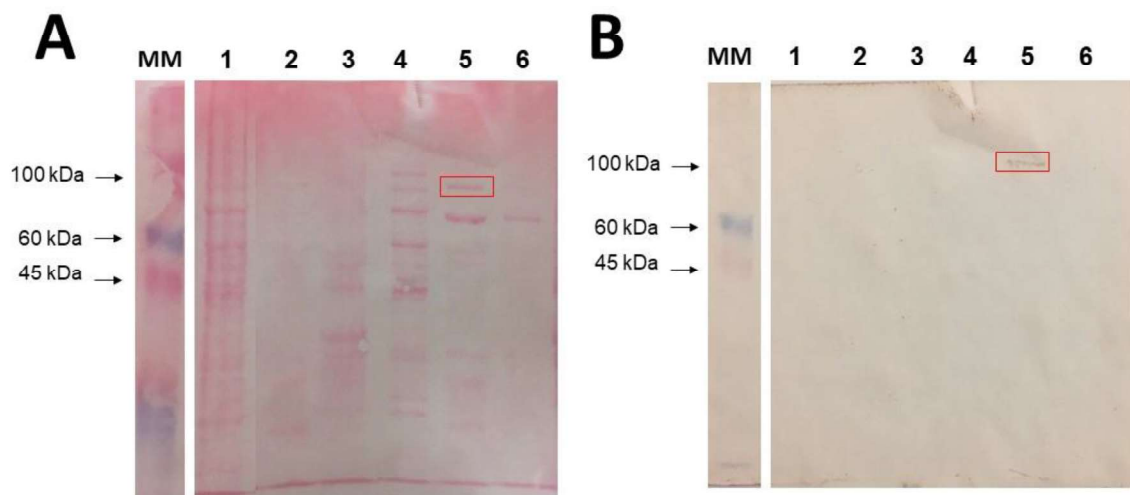
(Figura 4) com anticorpo anti-histidina. A quantificação da proteína purificada foi de aproximadamente 672 µg/L.

Figura 3. Avaliação da expressão da VAPGH 246 por SDS-PAGE 10% corado com Coomassie® Azul brilhante. MM: marcador molecular, 1: fração solúvel 246 sem purificar, 2: fração solúvel 246 purificada por cromatografia de afinidade (His-tag).



Fonte: A autora

Figura 4. Confirmação da expressão da VAPGH por *western blotting*. MM: marcador molecular, 1: fração solúvel BL21 sem purificar, 2: fração solúvel BL21 purificada por cromatografia de afinidade (His-tag), 3: fração insolúvel BL21 purificada por cromatografia de afinidade (His-tag), 4: fração solúvel 246 sem purificar, 5: fração solúvel 246 purificada por cromatografia de afinidade (His-tag), 6: fração solúvel 246 purificada por cromatografia de afinidade (His-tag). (A) *Western blotting* coloração com *Ponceau 1%*, (B) *Western blotting* revelação com anticorpo anti-histidina.

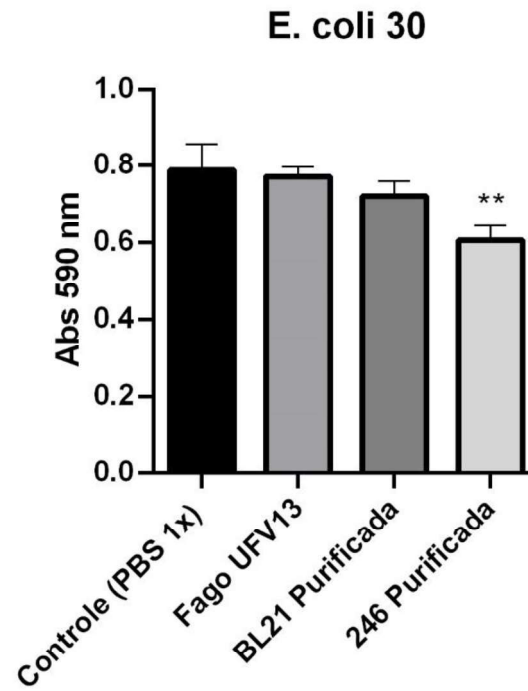


Fonte: A autora

#### 4.3.2 Atividade da enzima sobre a formação do biofilme

A enzima 246 purificada, obtida por expressão heteróloga em sistema procarioto, reduziu de forma significativa (\*\* $P < 0,01$ ) a formação do biofilme por *E. coli* 30, comparada com o tratamento com PBS 1x, ao contrário dos demais tratamentos, incluindo o fago ativo.

Figura 5. Ensaio de prevenção da formação do biofilme de *Escherichia coli* pela VAPGH 246 recombinante por 24 h em placas de 96 poços. O biofilme foi avaliado utilizando o método de cristal violeta 0,1%. \*\* $P < 0,01$ .



Fonte: A autora

#### 4.4 DISCUSSÃO

A VAPGH codificada pela ORF 246 do bacteriófago vB\_EcoM-UFV13 foi classificada como N-acetil-anhidromuramyl-L-alanina amidase putativa e possui homologia com a proteína estrutural gp37, referente à fibra da cauda longa do fago T4 de *Escherichia coli* (DUARTE et al., 2018). Amidases são enzimas que clivam as ligações glicano-peptídicas da parede celular, entre o ácido N-acetilmurâmico e a região L-alanina da cauda peptídica (CHANG, 2020; MACIEJEWSKA et al., 2018), desse modo biofilmes que apresentam esse tipo de ligação podem ser desestruturados com a aplicação dessas enzimas (RODRÍGUEZ-RUBIO et al., 2013). Muitos estudos descrevem o potencial antimicrobiano de VAPGH e endolisinas (FISCHETTI, 2010; RODRÍGUEZ et al., 2011a; YANG et al., 2018). Apesar da atividade muralítica de VAPGH já ser descrita em diversos fagos, poucos estudos são conhecidos sobre a expressão dessas proteínas recombinantes e sua atividade *in vitro* em biofilmes (RODRÍGUEZ-RUBIO et al., 2013).

RODRÍGUEZ e colaboradores (2011b) descreveram a enzima HydH5, codificada pela ORF58 do bacteriófago phiPLA88, que por análise comparativa de bioinformática revelou ser significativamente semelhante a outras peptidoglicano-hidrolases codificadas por fagos estafilocócicos, com atividade lítica contra *S. aureus*, demonstrando potencial antimicrobiano para terapia anti-estafilocócica. RASHEL e colaboradores (2008) descreveram a proteína gp61 do fago φMR11 de *Staphylococcus aureus*, com domínios líticos homólogos a CHAP (correspondendo a uma função amidase) e um domínio de lisozima, e demonstrou que a expressão heteróloga desses domínios, separadamente, acarretaram a lise eficiente de *S. aureus*. YANG e colaboradores (2018) já descreveram uma enzima com atividade de endolisina e VAPGH, a enzima Ply17, do fago phiYY de *Pseudomonas aeruginosa*, foi capaz de demonstrar atividade antimicrobiana contra *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. epidermidis* e *S. aureus*.

Na literatura a Gp37 de fagos T4 é descrita por possuir 1026 aminoácidos e peso molecular de aproximadamente 110 KDa, quando em forma monomérica (BARTUAL et al., 2010a, 2010b). De forma semelhante a ORF 246, possui 1286 aminoácidos e peso molecular de aproximadamente 100 kDa, sendo considerada uma

proteína de alto peso molecular, o que é um fator dificultador para expressão, dobramento correto e manutenção da conformação terciária da proteína (WÖHLKE, 2012).

Na literatura a expressão de gp37 foi observada na fração solúvel e com acúmulo da forma trimérica apreciável apenas quando co-expressa com duas chaperonas moleculares, Gp 57 e Gp 38, revelando que ambas as chaperonas são responsáveis pela sua montagem na partícula viral (BARTUAL et al., 2010a). A proteína Gp37 expressa isoladamente se acumulou na fração insolúvel e não foi observada nenhum trímero formado, nem quando co-expressa apenas com a Gp 57 (BURDA e MILLER, 1999), mostrando portanto que a Gp 38 é importante para o dobramento, bem como, para a incorporação de Gp37 na partícula de fago (BARTUAL et al., 2010a; HASHEMOLHOSSEINI et al., 1996).

A proteína 246, expressa de forma heteróloga, apresentada neste trabalho foi alcançada a partir da indução da expressão da *E. coli* BL21 (DE3) com 0,5 mM de IPTG por 20 h e a obtida na fração solúvel purificada. Ao contrário do foi o observado, quando a proteína Gp37 foi expressa isoladamente, sem as chaperonas.

O peptídeo sinal *OmpA*, obtido a partir da proteína A (*OmpA*), uma importante proteína da membrana externa de *E. coli*, é capaz de direcionar a secreção de enzimas para o espaço periplasmático (TAKAHARAS et al., 1985). A adição do peptídeo sinal à sequência da proteína durante a construção do inserto, foi o que provavelmente contribuiu para a obtenção da proteína na fração solúvel, o que não foi obtido quando a gp 37 foi expressa isoladamente, sem as chaperonas (BARTUAL et al., 2010a).

GUTIÉRREZ e colaboradores (2014) confirmaram a atividade da endolisina LysH5 contra biofilmes de *S.aureus* e *S. epidermidis*. A endolisina LysH5 reduziu as contagens de células sésseis estafilocócicas em 1-3 unidades logarítmicas, além da inibição de células persistentes, possibilitando sua utilização como adjuvante para alguns antibióticos. Embora sejam enzimas com atividades diferentes a proteína 246 e LysH5, uma VAPGH putativa e uma endolisina, atuam clivando o peptídeo glicano e desse modo podem atuar de formas semelhantes sobre biofilmes.

Neste trabalho confirmamos a atividade da 246, VAPGH putativa, sobre o biofilme de *E. coli*, hospedeiro do fago vB\_EcoM-UFV13 codificador da enzima, de tal

modo fago UFV13 foi utilizado em um dos tratamentos como controle, uma vez que este fago é capaz de infectar, assim como, desestruturar o biofilme da mesma (DUARTE et al. 2018). Entretanto não foi observado redução significativa pela ação do fago UFV 13, na prevenção da formação do biofilme por *E. coli*, apesar de ser descrito com potencial inclusive de prevenir a formação do biofilme de espécies não relacionadas, como BRS e *T. pyogenes* (DO CARMO, 2019; DUARTE et al., 2018). Este resultado provavelmente foi obtido devido ao baixo título viral,  $1 \times 10^5$  UFV/mL, utilizado no tratamento, haja vista que na literatura DO CARMO (2019) observou que o fago UFV13 foi capaz de prevenir a formação de biofilme desenvolvido pelo consórcio P48SEP, quando administrado em média ( $10^8$  UFP/mL) e alta ( $10^{12}$  UFP/mL) concentração.

O ensaio da atividade da enzima sobre o biofilme formado por *E. coli* confirmaram o potencial da enzima 246 recombinante em reduzir a formação do biofilme, entretanto estudos complementares devem ser realizados para confirmar sua atividade de amidase, além da avaliação da estabilidade termodinâmica e cinética para a caracterização da enzima, visto que o objetivo do estudo é a aplicação enzimática para o controle do biofilme produzido por bactérias redutoras de sulfato. Além disso a otimização da expressão deve ser realizada, uma vez que uma quantidade de proteína muito pequena foi expressa, aproximadamente 672 µg/L. BARTUAL e colaboradores(2010a) relataram que a co-expressão da enzima Gp 37 com chaperonas moleculares, resultou na expressão enzima, em maiores concentrações, 7 mg/L, mesmo que na fração insolúvel, deste modo a co-expressão da 246 com chaperonas moleculares pode resultar na otimização da expressão da enzima. Apesar da baixa concentração da proteína obtida a fração purificada da enzima 246 demonstrou efeito significativo, no controle da formação do biofilme de *E. coli* comparado ao fago, em baixa concentração, demonstrando potencial biotecnológico das VAPGHs.

## 4.5 CONCLUSÃO

A expressão heteróloga da proteína 246 codificada pelo bacteriófago vB\_EcoM-UfV13, foi confirmada por *Western blotting*, revelando uma proteína de massa molecular de aproximadamente 100 kDa. A enzima 246 purificada foi capaz de retardar a formação do biofilme de *E. coli* confirmando seu potencial de aplicação biotecnológico.

#### 4.6 REFERÊNCIAS

- AGARWAL, R.; TRIVEDI, J.; MITRA, D. High yield production of recombinant cyanovirin-N (antiviral lectin) exhibiting significant anti-HIV activity, from a rationally selected *Escherichia coli* strain. **Process Biochemistry**, v. 93, p. 1–11, 2020.
- AKANDA, Z. Z.; TAHA, M.; ABDELBARY, H. Current review—The rise of bacteriophage as a unique therapeutic platform in treating peri-prosthetic joint infections. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 36, n. 4, p. 1051–1060, 2018.
- BARTUAL, S. G. ; et al. Two-chaperone assisted soluble expression and purification of the bacteriophage T4 long tail fibre protein gp37. **Protein Expression and Purification**, v. 70, n. 1, p. 116–121, mar. 2010a.
- BARTUAL, S. G. et al. Structure of the bacteriophage T4 long tail fiber receptor-binding tip. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 47, p. 20287–20292, 23 nov. 2010b.
- BIMBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 7, n. 6, p. 1513–1523, 1979.
- BURDA, M. R.; MILLER, S. Folding of coliphage T4 short tail fiber in vitro. Analysing the role of a bacteriophage-encoded chaperone. **European Journal of Biochemistry**, v. 265, n. 2, p. 771–778, 15 out. 1999.
- CHANG, Y. **Bacteriophage-derived endolysins applied as potent biocontrol agents to enhance food safety** *Microorganisms* MDPI AG, , 1 maio 2020. Disponível em: </pmc/articles/PMC7285104/>. Acesso em: 7 jun. 2021
- DA SILVA DUARTE, V. et al. A T4virus prevents biofilm formation by *Trueperella pyogenes*. **Veterinary Microbiology**, v. 218, p. 45–51, 1 maio 2018.
- DO CARMO, A. J. **Influência do fago vB\_EcoM-UFV13 no biofilme formado pelo consórcio P48SEP**. [s.l.] Dissertação (mestrado) - Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2019.
- DUARTE, V. S.; DIAS, R. S.; KROPINSKI, A. M. .; XAVIER, A. S.; FERRO, C. G.; VIDIGAL, P. M. P.; SILVA, C. C.; DE PAULA, S. O. A T4virus prevents bio fi lm

formation by *Trueperella pyogenes*. **Veterinary Microbiology**, v. 218, n. 2, p. 45–51, 2018.

DUARTE, V. D. S. **Avaliação da atividade lítica dos bacteriófagos vB\_TpyM\_UFV13, vB\_TpyP\_UFV21 e vB\_TpyM\_UFV26 específicos para *Trueperella pyogenes* associada a problemas reprodutivos no puerpério.** [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2014.

DUARTE, V. S. et al. Complete genome sequence of vB\_EcoM-UFV13, a new bacteriophage able to disrupt *Trueperella pyogenes* biofilm. **Genome Announcements**, v. 4, n. 6, 29 dez. 2016.

FISCHETTI, V. A. **Bacteriophage endolysins: A novel anti-infective to control Gram-positive pathogens** *International Journal of Medical Microbiology* NIH Public Access, , ago. 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2010/08/18/pmc/articles/PMC3666336/>. Acesso em: 18 jun. 2021

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 623–633, 2010.

GARRETT, T. R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, v. 18, n. 9, p. 1049–1056, 2008.

GUTIÉRREZ, D.; RODRÍGUEZ-RUBIO, L.; MARTÍNEZ, B.; RODRÍGUEZ, A.; GARCÍA, P. Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 825, p. 15, 2016.

GUTIÉRREZ, D. . et al. Effective removal of staphylococcal biofilms by the endolysin LysH5. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. 8, 2014.

HASHEMOLHOSSEINI, S. et al. Characterization of the helper proteins for the assembly of tail fibers of coliphages T4 and  $\lambda$ . **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 21, p. 6258–6265, 1996.

J. SAMBROOK I D. W. RUSSELL. **Molecular cloning : a laboratory manual, III.** 3rd ed. ed. [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

MACIEJEWSKA, B.; OLSZAK, T.; DRULIS-KAWA, Z. **Applications of bacteriophages versus phage enzymes to combat and cure bacterial infections: an ambitious and also a realistic application?** *Applied Microbiology and*

**Biotechnology** Springer Verlag, , 1 mar. 2018. Disponível em: </pmc/articles/PMC5847195/>. Acesso em: 8 jun. 2021

MEISSNER, G. O. **Clonagem e expressão de toxina pertencente à família das notinas presente no veneno de Aranha-Marrom (*Loxosceles intermedia*)**. [s.l.] Dissertação (mestrado) - Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná. Paraná, p.72, 2012.

NISHIMA, W.; KANAMARU, S.; ARISAKA, F.; KITAO, A. Screw motion regulates multiple functions of T4 phage protein gene product 5 during cell puncturing. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 34, p. 13571–13576, 2011.

PEI, R.; LAMAS-SAMANAMUD, G. R. Inhibition of biofilm formation by T7 bacteriophages producing quorum-quenching enzymes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 17, p. 5340–5348, 2014.

RASHEL, M.; UCHIYAMA, J.; TAKEMURA, I.; HOSHIBA, H.; UJIHARA, T.; TAKATSUJI, H.; HONKE, K.; MATSUZAKI, S. Tail-associated structural protein gp61 of *Staphylococcus aureus* phage  $\phi$ mR11 has bifunctional lytic activity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 284, n. 1, p. 9–16, 2008.

RODRÍGUEZ-RUBIO, L.; MARTÍNEZ, B.; DONOVAN, D. M.; RODRÍGUEZ, A.; GARCÍA, P. Bacteriophage virion-associated peptidoglycan hydrolases: Potential new enzybiotics. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 427–434, 2013.

RODRÍGUEZ, L. et al. Lytic activity of the virion-associated peptidoglycan hydrolase HydH5 of *Staphylococcus aureus* bacteriophage vB-SauS-phiPLA88. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 138, p. 1–11, 2011a.

RODRÍGUEZ, L. et al. Lytic activity of the virion-associated peptidoglycan hydrolase HydH5 of *Staphylococcus aureus* bacteriophage vB-SauS-phiPLA88. **BMC Microbiology**, 2011b.

SOUSA, P.; MENDES, W. **Segurança do paciente: conhecendo os riscos nas organizações de saúde**. 2nd ed. ed. [s.l.] Editora Fiocruz, 2014.

TAKAHARAS, M. et al. **The ompA Signal Peptide Directed Secretion of Staphylococcal Nuclease A by *Escherichia coli***\***THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**. [s.l: s.n.].

VUITIKA, L. **Clonagem , Expressão Heteróloga E Purificação De Uma Nova Isoforma De Fosfolipase-D Presente No Veneno De Aranha- Clonagem , Expressão Heteróloga E Purificação De Uma Nova Isoforma De Fosfolipase-D Presente no veneno de aranha marrom (L. intermedia).** [s.l.] Dissertação (mestrado) - Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal Do Paraná. Paraná, p.100, 2012.

WÖHLKE, B. L. P. **Expressão heteróloga, purificação e caracterização da proteína hipoxantina guanina fosforribosiltransferase de Plasmodium falciparum.** [s.l.] Universidade Federal do Amazonas, 2012.

YANG, Y.; LE, S.; SHEN, W.; CHEN, Q.; HUANG, Y.; LU, S.; TAN, Y.; LI, M.; HU, F.; LI, Y. Antibacterial activity of a lytic enzyme encoded by *Pseudomonas aeruginosa* double stranded RNA Bacteriophage phiYY. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 1778, p. 1–7, 2018.