

ADRIELE JÉSSICA DO CARMO

**INFLUÊNCIA DO FAGO vB_EcoM-UFV13 NO BIOFILME FORMADO
PELO CONSÓRCIO P48SEP**

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

Coorientador: Roberto Sousa Dias

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2019**

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

T

C287i Carmo, Adriele Jéssica do, 1993-
2019 Influência do fago vB_EcoM-UFV13 no biofilme formado
pelo consórcio P48SEP / Adriele Jéssica do Carmo. – Vicosá,
MG, 2019.
66 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Sérgio Oliveira de Paula.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Bacteriófagos. 2. Bactéria redutora de sulfato.
3. Biodegradação. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia Agrícola. II. Título.

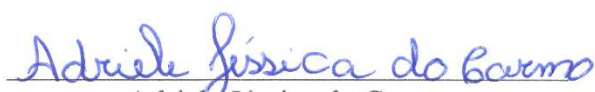
CDD 22. ed. 579.26

ADRIELE JÉSSICA DO CARMO

**INFLUÊNCIA DO FAGO vB_EcoM-UFV13 NO BIOFILME FORMADO
PELO CONSÓRCIO P48SEP**

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: 04 de julho de 2019.


Adrielle Jéssica do Carmo
Autor(a)


Sérgio Oliveira de Paula
Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar sempre presente em minha vida; por ter me permitido chegar até aqui, me abençoando e guiando meus passos, indicando sempre a melhor caminho. Aos meus pais, Penha e José, por me apoiarem e estarem sempre ao meu lado nos momentos felizes e, principalmente nos de angústia e desespero, além do amor e do carinho incondicionais. À minha irmã Aline, pelo apoio e amor, por sempre estar do meu lado.

À toda a minha família pelo apoio e carinho em todos os momentos da minha vida, mesmo distante.

Ao Juber, meu amor, pelo amor, carinho, companheirismo e compreensão durante esses anos. Por sempre acreditar no meu potencial. Ao meu sogro Romeiro, minha sogra Terezinha, por serem essas pessoas maravilhosas! Amo vocês!

Ao meu orientador Prof. Sérgio pela oportunidade e confiança em mim depositada. Sempre serei grata por ter aberto as portas do LIVM para que eu pudesse realizar minha jornada científica e por todos os ensinamentos durante esses dois anos.

Agradeço ao Roberto Sousa Dias, por ter me acolhido, pela paciência, pelos ensinamentos e pela confiança no meu trabalho.

Aos amigos do LIVM, por terem feito parte dessa experiência maravilhosa, por tornar os dias mais alegres e contribuírem de forma direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, de forma especial Deborah que me auxiliou na montagem dos experimentos.

Às minhas amigas Mariana, Evelyn, Josi e Taise, pela amizade, por todos os momentos bons, conversas e risadas.

Aos amigos que UFV me deu, por fazerem meus dias mais felizes e menos solitários.

Aos professores Hilário Cuquetto Mantovani e Wellington Ronildo Clarindo, por permitirem utilizar a infraestrutura dos seus laboratórios, o que foi essencial para obtenção dos resultados.

À Universidade Federal de Viçosa e Departamento de Microbiologia pela oportunidade de realizar o mestrado.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia que ministraram as disciplinas que cursei durante o mestrado, pelos ensinamentos durante este período.

Agradeço aos meus amigos do mestrado, em especial Mirele, Osiel, Marlon, Jéssica e Izabel. As disciplinas não seriam as mesmas sem vocês.

À CNPq, pela bolsa concedida, e à FAPEMIG, CAPES e Petrobrás, pelo financiamento do projeto.

Agradeço à banca examinadora pela disponibilidade e considerações.

Agradeço ao Núcleo de Análise de Biomoléculas e ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV. Obrigado pela atenção e disposição em me ajudar.

Enfim, o meu muito obrigado a todos que contribuíram para que esse trabalho fosse concluído!

RESUMO

CARMO, Adrielle Jéssica do, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2019. **Influência do fago vB_EcoM-UFV13 no biofilme formado pelo consórcio P48SEP**. Orientador: Sérgio Oliveira de Paula. Coorientador: Roberto Sousa Dias.

O controle da corrosão microbiologicamente induzida (MIC) é um desafio crescente no setor de exploração de petróleo e gás. A MIC é o resultado de uma série de reações eletroquímicas, influenciadas ou dirigidas por microrganismos, como as bactérias redutoras de sulfato (BRS), que se acumulam na superfície das tubulações formando os biofilmes, ocasionando grandes prejuízos econômicos. As BRS são microrganismos anaeróbios que utilizam sulfato como aceptor final de elétrons, levando a produção de sulfeto de hidrogênio, um produto altamente reativo, corrosivo e tóxico. A principal forma de controle das BRS atualmente, é a injeção de biocidas, no entanto, esses produtos químicos não conseguem penetrar na matriz do biofilme e alcançar os microrganismos presentes, além do mais, são caros, requerem a aplicação contínua, e podem levar à geração de bactérias resistentes, representam um risco para os seres humanos e o meio ambiente devido à sua toxicidade e a persistência nos resíduos industriais. Dessa forma, há a necessidade de desenvolver abordagens mais eficientes e específicas no controle do processo de biocorrosão no setor petrolífero. Neste trabalho, foi avaliado o potencial do fago vB_EcoM-UFV13 em três diferentes concentrações (baixa: 10^4 UFP/mL, média: 10^8 UFP/mL e alta: 10^{12} UFP/mL) na prevenção da formação de biofilme em cupons de aço carbono pelo consórcio bacteriano P48SEP constituído por BRS isolado de água de produção obtida da exploração de petróleo. Através da microscopia eletrônica de varredura, análise da composição química do biofilme e contagem celular por meio de citometria de fluxo demonstraram a capacidade do fago em média (10^8 UFP/mL) e alta (10^{12} UFP/mL) concentração de prevenir a formação de biofilme desenvolvido pelo consórcio, diminuir as principais biomoléculas responsáveis pelo processo de adesão e estabilização do biofilme, e também reduzir o número de células vivas aderidas ao cupom. Além disso, a presença do vírus foi capaz de alterar o padrão de expressão gênica de genes relacionados à formação do biofilme e genes envolvidos na captura, transporte e armazenamento do ferro nas células, assim como, os níveis de abundância relativa de proteínas relacionadas à formação do biofilme e resposta celular ao estresse. Este estudo mostra pela primeira vez a capacidade de um bacteriófago de prevenir a formação de biofilme proveniente de BRS, sendo uma alternativa promissora para o controle da biocorrosão em oleodutos e tanques de armazenamentos de petróleo.

Palavras-chaves: Fago. Bactérias redutoras de sulfato. Biocorrosão.

ABSTRACT

CARMO, Adrielle Jéssica do, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2019. **Influence of phage vB_EcoM-UFV13 on the biofilme formed by consortium P48SEP.** Adviser: Sérgio Oliveira de Paula. Co-adviser: Roberto Sousa Dias.

Control of microbiologically induced corrosion (MIC) is a growing challenge in the oil and gas exploration sector. MIC is the result of a series of electrochemical reactions, influenced or directed by microorganisms, such as sulphate-reducing bacteria (SRB), which accumulate on the surface of the pipes forming biofilms, causing major economic losses. SRB are anaerobic microorganisms that use sulfate as the final electron acceptor, leading to the production of hydrogen sulfide, a highly reactive, corrosive and toxic product. The main form of control of SRB today is the injection of biocides, however, these chemicals cannot penetrate the biofilm matrix and reach the present microorganisms, besides being expensive, requiring continuous application, may lead to the generation resistant bacteria pose a risk to humans and the environment due to their toxicity and persistence in industrial waste. Thus, there is a need to develop more efficient and specific approaches to control the biocorrosion process in the oil sector. In this work, the potential of phage vB_EcoM-UFV13 at three different concentrations (low: 10^4 PFU/mL, medium: 10^8 PFU/mL and high: 10^{12} PFU/mL) in the prevention of biofilm formation in carbon steel coupons by bacterial consortium was evaluated. P48SEP consists of BRS isolated from production water obtained from oil exploration. Through scanning electron microscopy, analysis of biofilm chemical composition and cell count by flow cytometry demonstrated the phage capacity in medium (10^8 PFU/mL) and high (10^{12} PFU/mL) concentration to prevent biofilm formation. developed by the consortium, reduce the main biomolecules responsible for the process of adhesion and stabilization of the biofilm, and also reduce the number of living cells adhered to the coupon. In addition, the presence of the virus was able to alter the pattern of gene expression of genes related to biofilm formation and genes involved in the capture, transport and storage of iron in cells, as well as levels of relative abundance of proteins related to formation. of biofilm and cellular stress response. This study shows for the first time the ability of a bacteriophage to prevent the formation of biofilm from SRB and is a promising alternative for the control of biocorrosion in oil pipelines and storage tanks.

Keywords: Phage. Sulphate-reducing bacteria. Biocorrosion.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1. Biofilme	12
2.2. Bactérias redutoras de sulfato – BRS.....	14
2.3. Corrosão microbiologicamente induzida	15
2.5. Bacteriófagos e a fagoterapia	18
2.6. Utilização de bacteriófagos na prevenção e controle de biofilme	22
3. OBJETIVOS.....	24
3.1. Objetivo geral.....	24
3.2. Objetivos específicos	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1. Cultivo do consórcio bacteriano	25
4.2. Isolamento e identificação bacteriana	25
4.2.1. Isolamento bacteriano.....	25
4.2.2. Identificação e análise filogenética do gene RNAr 16S	26
4.3. Propagação de bacteriófago	26
4.3.1. Estoque <i>E. coli</i>	26
4.3.2. Propagação do fago vB_EcoM-UFV13.....	27
4.3.3. Titulação de bacteriófagos	27
4.4. Análise da especificidade de hospedeiros do fago vB_EcoM-UFV13.....	28
4.5. Análise da morfologia do biofilme em cupons de aço carbono.....	28
4.5.1. Preparo dos cupons de aço carbono.....	28
4.5.2. Microscopia eletrônica de varredura.....	28
4.6. Análise da composição do biofilme.....	29
4.6.1. Extração de EPS	29
4.6.2. Quantificação de carboidrato	30
4.6.3. Quantificação de proteína.....	30
4.6.4. Quantificação de DNA.....	30
4.7. Contagem celular	30
4.8. Análise proteômica.....	31
4.9. Análise de expressão gênica por PCR em tempo real.....	31
4.9.1. Seleção dos genes	31
4.9.2. Síntese dos primers.....	31

4.9.3.	Extração do RNA total.....	32
4.9.4.	Síntese de cDNA.....	33
4.9.5.	qPCR.....	33
4.10.	Análise estatística.....	33
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1.	Identificação e análise filogenética utilizando o gene RNAr 16S.....	34
5.2.	Análise da especificidade do fago vB_EcoM-UFV13.....	35
5.3.	Análise da morfologia do biofilme em cupons de aço carbono.....	37
5.4.	Análise da composição do biofilme.....	38
5.5.	Contagem celular	40
5.6.	Análise proteômica.....	41
5.7.	Análise de expressão gênica por q-PCR.....	45
6.	CONCLUSÃO	48
7.	REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
8.	INFORMAÇÕES SUPLEMENTARES	58

1. INTRODUÇÃO

A demanda por petróleo aumentou drasticamente nas últimas décadas, sendo a principal fonte de energia no mundo (Zou et al., 2016). No entanto, as redes de gasodutos e as infraestruturas associadas a exploração de petróleo estão sujeitas aos diferentes mecanismos de corrosão, um das quais é a corrosão microbiologicamente induzida (MIC) ou biocorrosão, que causa grandes perdas econômicas para o setor (Alabbas et al., 2013). Estima-se que o processo de biocorrosão seja responsável por 20 a 40% dos casos graves de corrosão nas instalações de exploração e transporte de petróleo. Além disso, cerca de 70 a 95% dos vazamentos internos de oleodutos são causados principalmente pela MIC (Javaherdashti; Little e Lee, 2007). A MIC é o resultado de uma série de reações eletroquímicas, influenciadas ou dirigidas por microrganismos, que se acumulam na superfície das tubulações e eventualmente formam os biofilmes (Kip e Van Veen, 2015). Os biofilmes são resistentes aos biocidas e à remoção física, protegendo as células microbianas do ambiente externo, sendo composto principalmente por microrganismos, água e uma matriz de exopolissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos (Yuan e Pehkonen, 2009; Balcazar et al., 2015; Dang e Lovell, 2016).

As camadas mais profundas dos biofilmes maduros (mais próximas da superfície) são em grande parte anaeróbicas, devido ao consumo de oxigênio pela respiração dos microrganismos aeróbicos, criando um habitat ideal para as bactérias redutoras de sulfato (BRS). Elas constituem o principal grupo de microrganismos responsáveis pela MIC (Muyzer e Stams, 2008; Blackwood, 2018). Além disso, as BRS são capazes de reduzir o sulfato ao sulfeto de hidrogênio (H_2S), um subproduto altamente reativo, tóxico e corrosivo. Além disso, o aumento da concentração de H_2S nos tanques de armazenamento de petróleo e nos oleodutos promove a acidificação do óleo, processo conhecido como *souring*, alterando a qualidade do óleo extraído. Também, o H_2S interage com o ferro presente no aço levando à formação de sulfeto de ferro (FeS), que precipita e, conseqüentemente, levar ao entupimento de estruturas metálicas, como oleodutos e reservatórios de petróleo, gerando perdas significativas (Nemati et al., 2001).

Atualmente, há um número limitado de estratégias eficazes para inibir o crescimento de biofilmes e a MIC no setor de exploração e transporte de petróleo, sendo a principal metodologia a utilização de biocidas químicos (Xu et al., 2016). Porém, muitos desses biocidas não penetram na matriz do biofilme e não alcançam os microrganismos presentes no biofilme, responsáveis pelo processo de corrosão do metal. Além do mais, os biocidas são caros, podem levar à geração de bactérias resistentes e representam um risco considerável para os seres

humanos e ao meio ambiente devido à sua toxicidade e a persistência nos resíduos industriais (Guiamet e Gómez De Saravia, 2005; Little et al., 2007; Bhola et al., 2014). Com isso, as indústrias de petróleo estão numa busca constante por novas estratégias que possam prevenir a formação de biofilmes ou controlá-los, visando uma diminuição das perdas econômicas causadas pela MIC e diminuição nos impactos ambientais. Uma alternativa é o uso de biocidas desenvolvidos com base em agentes bacteriolíticos chamados bacteriófagos (Sutherland et al., 2004; Garrett et al., 2008; Rosa et al., 2016; Souza et al., 2017).

A grande maioria dos fagos apresentam em sua sequência genômica genes que codificam depolimerases, hidrolases e proteínas líticas. Tais enzimas atuam como adjuvantes para infecção fágica, uma vez que são capazes de degradar os compostos que formam a matriz do biofilme, possibilitando um maior acesso dos bacteriófagos aos receptores celulares presentes na superfície bacteriana, inicialmente inacessíveis, além disso, as bactérias ficam mais susceptíveis a ação de antibióticos e de outros agentes antimicrobianos, como os biocidas químicos utilizados no controle e prevenção dos biofilmes (Sutherland et al., 2004; Pei e Lamas-Samanamud, 2014; Yan et al., 2014; Pires et al., 2016). Porém, pouco se sabe do uso dos bacteriófagos no controle de bactérias redutoras de sulfato (BRS), até então não tem nenhum relato na literatura da utilização de fagos não-específicos que previnam a formação de biofilme por BRS.

Dessa forma, medidas que previna a formação de biofilme por BRS podem ser capazes de reduzir o processo de biocorrosão em oleodutos e tanques de reservatório de petróleo. Neste trabalho, foi avaliado o potencial do fago vB_EcoM-UFV13 na prevenção da formação de biofilme em cupons de aço carbono pelo consórcio bacteriano P48SEP isolado de água de produção obtida da exploração de petróleo. O fago vB_EcoM-UFV13 é um membro do gênero *T4virus*, apresentando uma ampla gama de hidrolases em seu genoma. Acredita-se que a grande quantidade de VAPGS (Virion-Associated Peptidoglycan Hydrolases) possa interferir na formação do biofilme por interagir e degradar as substâncias poliméricas presentes na matriz do biofilme (Duarte et al., 2016).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biofilme

Em ambientes naturais as bactérias podem viver de forma independente, como células planctônicas, ou formarem comunidades complexas, que sobrevivem aderidas em superfícies como células sésseis, formando biofilme. Biofilmes são encontrados em diversos ambientes, sejam eles naturais ou artificiais (Balcazar et al., 2015). Sendo considerado um complexo ecossistema de microrganismos dispersos em uma matriz extracelular. Essa matriz contém diferentes componentes, sendo proteína, polissacarídeos e DNA os mais importantes no processo de formação do biofilme. A presença de polissacarídeos na matriz do biofilme fornece diversos benefícios às células presentes naquele ambiente, incluindo adesão e proteção. O processo de adesão facilita a colonização de diferentes tipos de superfícies, permitindo que as bactérias resistam aos movimentos de fluídos que poderiam ocasionar a desagregação das células. Além disso, os polissacarídeos fornecem para as células presentes no biofilme proteção contra o processo de dessecação e agentes antimicrobianos (Limoli et al., 2015). Já os componentes proteicos presentes no biofilme incluem proteínas extracelulares secretadas, adesinas e apêndices celulares, como flagelos e pili. As proteínas da matriz do biofilme estão envolvidas no processo de ligação das células às superfícies, estabilizando a matriz do biofilme por meio das interações com os outros componentes presentes no biofilme, como os polissacarídeos e ácidos nucléicos, construindo uma estrutura tridimensional do biofilme (Fong e Yildiz, 2015). O DNA extracelular é um componente fundamental na matriz do biofilme na estabilização e adesão (Whitchurch et al., 2002).

A interação e fixação dos microrganismos às superfícies é um processo complexo, com várias variáveis que podem afetar o resultado, como por exemplo: temperatura, pH, velocidade do fluxo, concentração e biodisponibilidade de nutrientes, presença ou ausência de agentes antimicrobianos e presença de autoindutores do *quorum sensing* (Forsythe, 2011; Dang e Lovell, 2016). Em geral, a fixação ocorrerá mais prontamente em superfícies mais ásperas e hidrofóbicas. Primeiramente, ocorre a formação de uma fina camada na superfície metálica devido à deposição de moléculas orgânicas, que facilita a aderência dos microrganismos presentes em solução aquosa. A formação dessa fina camada altera principalmente a carga eletrostática e a molhabilidade da superfície metálica facilitando a segunda etapa de formação do biofilme, o processo de adesão microbiana. Os apêndices celulares como flagelos, pili e fimbrias favorecem também o processo de adesão. A etapa de adesão é considerada reversível,

podendo ocorrer o retorno das células ao estado planctônico (Donlan, 2002; Videla e Herrera, 2005; Petrova e Sauer, 2012; Toyofuku et al., 2016).

Após a colonização superficial, a próxima etapa compreende a adesão irreversível, caracterizada pela formação de microcolônias, que correspondem a um agregado de células, aderidas entre si e a uma superfície. A partir dessa etapa há um crescimento significativo na expressão de genes envolvidos na comunicação célula-célula (*quorum sensing*) e na produção de EPS, favorecendo o processo de fixação (Zhao et al., 2013; Toyofuku et al., 2016). A quarta etapa é a maturação, a qual acontece por meio do aumento da densidade populacional e, também, pela produção e deposição de EPS, aumentando a espessura do biofilme e a estabilidade da estrutura contra possíveis perturbações ambientais. Por fim, algumas células do biofilme maduro começam a se desprender e se dispersar no ambiente como células planctônicas, podendo iniciar novo ciclo de formação de biofilme, como mostrado na figura 1 (Donlan, 2002; Forsythe, 2011).

Figura 1: Representação esquemática das diferentes etapas de formação do biofilme.



Fonte: Adaptado: (Toyofuku et al., 2016).

A colonização superficial e a subsequente formação do biofilme fornecem aos microrganismos presentes importantes vantagens, como: proteção contra desinfetantes, biocidas e ambientes dinâmicos, auxílio na captura e transporte de nutrientes por difusão, o que permite sua sobrevivência em condições deficientes em nutriente e promove uma melhora nas interações com outros microrganismos (Garrett et al., 2008; Dang e Lovell, 2016).

Em ambiente marinho, a presença de biofilme pode acelerar as taxas de corrosão do aço carbono encontrado nas instalações de exploração de petróleo em várias ordens de grandeza. O

biofilme tem a capacidade de alterar localmente as concentrações de oxigênio dissolvido, cloreto e outras espécies iônicas, assim como o pH, impactando nas taxas de corrosão (Little et al., 1991).

A corrosão mais danosa ocorre na presença de biofilme multiespécie. Em tais biofilmes, as interações entre diferentes espécies podem acelerar o processo de corrosão microbiológica em comparação aos biofilmes formados por espécie única. Um exemplo são as bactérias produtoras de ácido, elas produzem e liberam metabólitos, como acetato, que atua como fonte de carbono para bactérias redutoras de sulfato (BRS), podendo acelerar significativamente a taxa de corrosão. Outro exemplo, são biofilmes constituídos de microrganismos aeróbicos e anaeróbicos, os aeróbios não são corrosivos, porém, eles consomem o oxigênio presente, criando um ambiente anaeróbico na interface do biofilme/metal, propício para o crescimento de anaeróbicos corrosivos (Muyzer e Stams, 2008).

2.2. Bactérias redutoras de sulfato – BRS

As bactérias redutoras de sulfato (BRS) são um grupo de microrganismos anaeróbicos capazes de reduzir o sulfato em sulfeto de hidrogênio (H₂S) como produto final do seu metabolismo, utilizando compostos orgânicos ou H₂ como doadores de elétrons. O gás sulfeto de hidrogênio produzido é altamente reativo, corrosivo e tóxico para o ser humano. As BRS constituem o principal grupo de microrganismos responsáveis pelo processo de corrosão microbiologicamente induzida (MIC) (Madigan et al., 2008; Muyzer e Stams, 2008; Enning e Garrelfs, 2014).

Esses microrganismos podem ser encontrados numa variedade de ambientes, tendo já sido detectados em sedimentos marinhos e de água doce, em poços de petróleo, esgoto e no solo. Eles também estão presentes em organismos vivos, como ruminantes e no trato intestinal humano. Além disso, as BRS são capazes de crescer em ambientes com ampla faixa de temperatura, pH e salinidade (Heidelberg, J. F. et al., 2004).

Os microrganismos redutores de sulfato desempenham um papel fundamental nos ciclos de carbono e enxofre, sendo muito utilizados nos processos de biorremediação de metais pesados. Apesar da sua importância ecológica, as BRS tem causado grandes perdas econômicas principalmente em oleodutos e plataformas de exploração de petróleo, devido ao seu envolvimento no processo de biocorrosão das estruturas metálicas em ambientes anaeróbicos (Heidelberg, J. F. et al., 2004; Muyzer e Stams, 2008; Dong et al., 2011; Ayangbenro et al., 2018).

Existe diversos gêneros bacterianos no grupo das BRS, no entanto, o gênero *Desulfovibrio* é o segundo gênero que engloba o maior número de espécies. É o mais estudado, devido a sua onipresença e seus importantes papéis nos processos químicos (Voordouw, 2002; Muyzer e Stams, 2008; Kovac et al., 2018). *Desulfovibrio vulgaris* está entre as espécies mais estudado desse gênero, foi isolado do solo argiloso, perto de Hildenborough (Reino Unido), sendo a primeira espécie de BRS sequenciada e caracterizada como organismo modelo (Heidelberg, John F. et al., 2004).

Algumas cepas estão relacionadas a indústria petrolífera, como a *Desulfovibrio marinus*, que foi inicialmente caracterizada a partir de um isolado (DSM 18311) proveniente de sedimentos marinhos da Tunísia, em 2007. Também em 2007, uma nova cepa (JCM 14040) foi isolada a partir de amostras coletadas num tanque de separação óleo-água que tratava fluidos de produção de petróleo numa plataforma localizada no Golfo do México (Dhia Thabet et al., 2007). Em 2018, uma nova cepa foi isolada de uma amostra de separador de produção de uma plataforma de extração de petróleo da Bacia de Campos, Rio de Janeiro, Brasil.

D. marinus são organismos estritamente anaeróbios, em forma de vibrio ou sigmóides e apresentam coloração de Gram negativa, crescem a 20–50 °C, com crescimento ótimo a 37 °C. São considerados organismos halófilos moderados, por crescerem na presença 0,5 a 11% de NaCl, com crescimento ótimo em torno de 2,5 a 5 % (p/v). O pH ótimo para o crescimento é de 7,0. Utiliza o H₂, formiato, fumarato, lactato, malato, piruvato, succinato e frutose como doadores de elétrons e utiliza como aceptor final de elétrons o enxofre elementar, sulfato, tiosulfato e sulfito (Dhia Thabet et al., 2007).

2.3. Corrosão microbiologicamente induzida

Corrosão microbiologicamente induzida (MIC) ou biocorrosão refere-se à deterioração de materiais, como ferro, aço, concreto e rocha, devido reações eletroquímicas que são proporcionadas ou influenciadas por microrganismos em condições aeróbias ou anaeróbias, frequentemente presentes no biofilme (Kip e Van Veen, 2015). Sob condições anóxicas, as bactérias redutoras de sulfato são consideradas os principais microrganismos causadores da MIC (Enning e Garrelfs, 2014). Embora a BRS seja o principal grupo de microrganismo relacionado a tal processo, outros microrganismos associados ao processo de biocorrosão do ferro e do aço são as bactérias oxidantes de enxofre, oxidantes de ferro, redutores de ferro, oxidantes de manganês e produtoras de ácido (Hamilton, 2003; Xu et al., 2016).

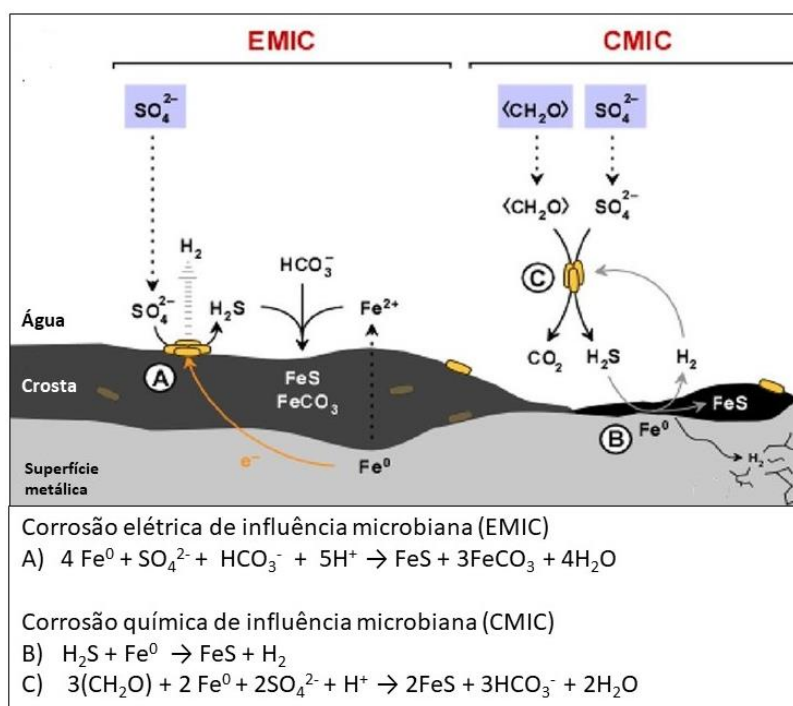
O MIC gera grandes perdas econômicas, que afeta uma ampla variedade de indústrias e serviços públicos, como: transporte marítimo, refinarias de petróleo e gás, sistemas de esgoto e água potável, edifícios históricos e estátuas, com um custo direto de US\$ 30 a US\$ 50 bilhões anuais em todo o mundo (Del Junco et al., 1992; Warscheid e Braams, 2000; Barton e Hamilton, 2007; Xu et al., 2013; Lv et al., 2014). Como exemplo dos danos ambientais e econômicos, em março 2006 no Alasca, o processo de biocorrosão foi o principal responsável pelo vazamento de petróleo de um oleoduto, resultando em um grande aumento nos preços globais do petróleo (A. Jacobson, 2007).

A MIC causada por microrganismos anaeróbios principalmente as BRS pode ser classificada em dois tipos de acordo com o metabolismo. O primeiro tipo é a corrosão elétrica de influência microbiana (EMIC). Os microrganismos presentes na superfície do metal necessitam de uma fonte de energia para suas atividades metabólicas, na ausência de doadores de elétrons, as células presentes no interior do biofilme irão utilizar o ferro elementar (Fe^0) como doador de elétrons alternativo para a oxidação do sulfato. A oxidação microbiana de 4 moles de Fe^0 a Fe^{2+} é acoplada à redução de apenas 1 mol de sulfato. Consequentemente, a molécula de H_2S gerada a partir desta reação interage com 1 mol de Fe^{2+} que precipita na forma de FeS (sulfeto de ferro), enquanto que os 3 moles restante de Fe^{2+} precipitam como minerais de ferro não sulfúrico, como por exemplo, carbonato, que é abundante em ambientes anóxicos. O segundo tipo é a corrosão química de influência microbiana (CMIC) (Figura 2). Nesse caso, os microrganismos são capazes de danificar as estruturas metálicas de maneira indireta através da secreção de metabólitos com consequente ação corrosiva, como sulfeto de hidrogênio, produto final da redução do sulfato, utilizando compostos orgânicos ou hidrogênio como doador de elétrons. O sulfeto de hidrogênio gerado reage com o ferro metálico, precipitando na forma de sulfeto de ferro (Cordas et al., 2008; Enning e Garrelfs, 2014; Kip e Van Veen, 2015).

Além disso, as BRS causam danos na infra-estrutura metálica de outra forma, o sulfeto de hidrogênio produzido a partir da redução do sulfato desacelera a combinação de átomos de hidrogênio em hidrogênio molecular na superfície do metal, isso permite a difusão de uma fração maior de átomos de hidrogênio na matriz metálica. A presença de gás hidrogênio (H_2) dentro do metal causa fragilização do metal, gerando o craqueamento do metal sob condições de estresse mecânico (por exemplo, em tubos pressurizados), que pode levar ao rompimento de tubulações (Park et al., 2008; Enning e Garrelfs, 2014).

Devido, à alta concentração de células sésseis em relação à concentração de células planctônicas e à estrutura densa do biofilme, há o impedimento da difusão dos metabólitos corrosivos, o que mantém as concentrações mais elevadas, favorecendo o surgimento dos *pits* de corrosão (Xu et al., 2013; Dall'agnol et al., 2014).

Figura 2: Ilustração esquemática dos diferentes tipos de corrosão do ferro por bactérias redutoras de sulfato.



Fonte: Adaptado (Enning e Garrelfs, 2014).

Problemas secundários nas instalações de exploração de petróleo ocorrem devido à formação de biofilme de BRS. O primeiro é a produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S) à partir da redução do sulfato, o que acelera o processo de corrosão e provoca a acidificação do petróleo (*souring*), necessitando sua remoção e aumentando o custo de produção. Além disso, o H_2S é um gás que apresenta alta toxicidade, representando um risco elevado para a saúde dos trabalhadores nas instalações de exploração de petróleo (Antonio et al., 2000; Tang et al., 2009; Elmawgoud et al., 2015). O segundo é a produção de sulfeto de ferro (FeS) uma subproduto da oxidação do ferro, que pode precipitar e consequentemente, obstruir o fluxo de petróleo nos poços e nos oleodutos, bem como nas usinas de processamento e refino, gerando perdas significativas para a indústria petrolífera (Mahmoud et al., 2015).

2.4. Controle da formação do biofilme

O processo de biocorrosão nas instalações de exploração e transporte de petróleo tem gerado um aumento no custo da exploração de petróleo, em consequência da deterioração das tubulações e equipamentos (Bhola et al., 2014). Devido às perdas econômicas causadas pela MIC existe muito interesse por parte das petrolíferas no desenvolvimento de métodos que possam remover e/ou prevenir a formação de biofilme (Garrett et al., 2008).

A prevenção e o tratamento contra a MIC consistem em destruir as células microbianas e/ou prevenir o desenvolvimento do biofilme (Guiamet e Gómez De Saravia, 2005). Existem algumas técnicas adotadas pelas indústrias de petróleo e gás para prevenir ou controlar a formação de biofilmes. Essas técnicas incluem: raspagem mecânica, aplicação de biocidas químicos e controle biológico. Entre as metodologias citadas, a mais utilizada é o uso de biocidas químicos. No entanto, os biocidas são caros, representam um risco considerável para os humanos e o meio ambiente, sobretudo, devido à sua toxicidade e a persistência nos resíduos industriais (Javaherdashti; Guiamet e Gómez De Saravia, 2005; Little et al., 2007; Reza, 2008; Bhola et al., 2014). Além disso, os biocidas muitas vezes não são totalmente efetivos sob os microrganismos causadores da corrosão, provavelmente devido à dificuldade do produto químico em penetrar nos densos biofilmes formados nas paredes das tubulações. Por estas razões, estratégias alternativas, mais eficientes no controle do processo de biocorrção do que as atuais, são de grande interesse para a indústria do petróleo, sendo o uso de bacteriófagos um método alternativo para controlar o crescimento de BRS com um impacto ambiental reduzido (Garrett et al., 2008; Rosa et al., 2016; Souza et al., 2017).

2.5. Bacteriófagos e a fagoterapia

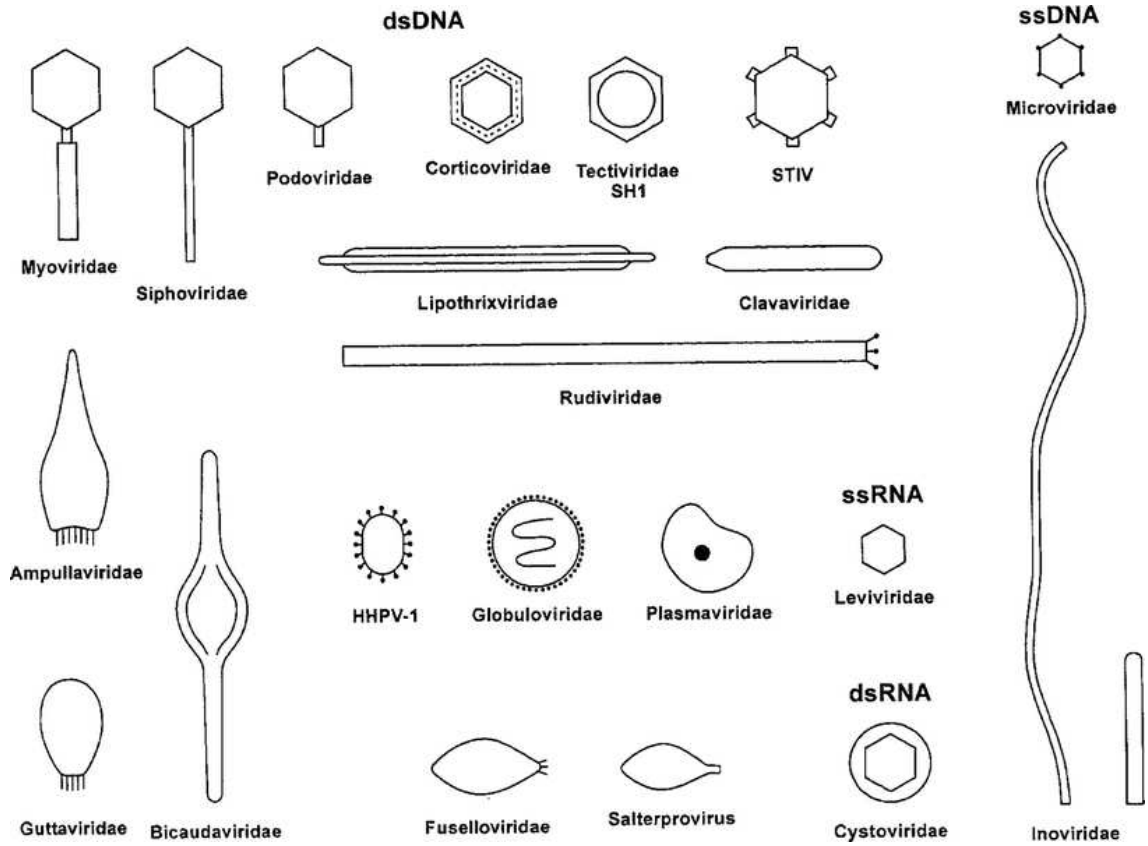
Os bacteriófagos (ou simplesmente fagos) são vírus bacterianos, mais abundantes no planeta, sendo inofensivo para todos os organismos, incluindo humanos, exceto por seus hospedeiros bacterianos (Wommack e Colwell, 2000; Harada, Liliam K. et al., 2018). A descoberta dos fagos, foi reportada por mais de um pesquisador, de forma independente. Em 1896 ocorreu o primeiro relato da presença dos bacteriofagos, quando Hankin observou que a água dos rios Jumma e Ganges na Índia possuía propriedades antibacterianas, sendo responsável pela redução do número de casos de infecção gastrointestinal nas aldeias próximas do rio (Abedon et al., 2011). Quase 20 anos depois, Frederick W. Twort, relatou um fenômeno similar ao de Hankin, porém com culturas de *micrococcus*. Posteriormente, em 1917 Félix d'Herelle observou o surgimento de pequenas áreas claras em meio ao crescimento bacteriano,

identificando o agente bactericida como um vírus parasita bacteriano, ao qual chamou de bacteriófago.

O potencial dos fagos como agentes antibacterianos foi rapidamente reconhecido e aplicado no combate de patógenos bacterianos. Essa abordagem da era pré-antibióticos ficou conhecida como fagoterapia. Com a descoberta dos antibióticos e com os resultados variáveis da fagoterapia, essa técnica foi abandonada no ocidente, sendo mantida somente por alguns países da Europa oriental. Na época, os antibióticos tinham vantagens óbvias em termos de ampla cobertura, facilidade de produção e patenteabilidade, assim, a utilização dos fagos no controle bacteriano foi colocada em segundo plano. Hoje, devido ao surgimento de bactérias multirresistente, a fagoterapia vem sendo retomada (Bush et al., 2011; Keen e Adhya, 2015).

Os bacteriófagos são considerados parasitas obrigatórios, por não possuem metabolismo próprio, necessitam do metabolismo, dos recursos energéticos e materiais dos seus hospedeiros para sua multiplicação. Esses vírus 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 e/ou uma membrana lipídica e podem apresentar diversas formas e tamanhos (poliédrica, filamentosa, pleomórfica ou caudada). A grande maioria dos fagos descritos na literatura são pertencentes à ordem *Caudovirales*, que engloba as famílias *Myoviridae* (cauda curta e contrátil), *Siphoviridae* (cauda longa e não contrátil), *Podoviridae* (cauda curta e não contrátil) e *Ackermannviridae* (figura 3) (Ackermann e Prangishvili, 2012; Adriaenssens et al., 2018).

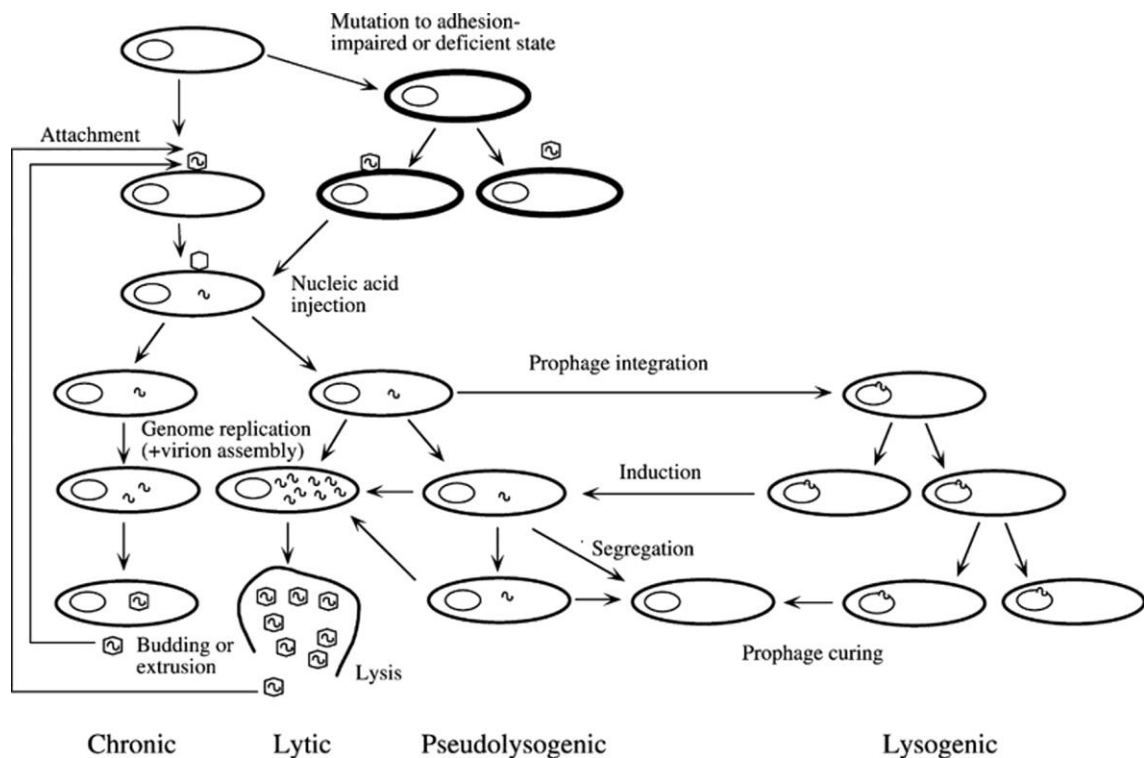
Figura 3: Principais morfotipos de bacteriófagos caracterizados.



Fonte: (Ackermann e Prangishvili, 2012).

Os fagos apresentam diferentes ciclos de vida, como demonstrado na figura 4. Inicialmente os vírus reconhecem receptores celulares (processo de adsorção) e liberam seu material genético no interior do hospedeiro, onde irão seguir um dos diferentes ciclos de vida. No ciclo lítico os bacteriófagos utilizam a maquinaria metabólica do hospedeiro, redirecionando para a produção de novas partículas virais. Isto inclui a replicação do seu genoma, síntese proteica e montagem das novas partículas virais. Já o ciclo lisogênico, é característico de bacteriófagos temperados, no qual eles são capazes de integrar seu genoma viral ao genoma bacteriano, formando o profago. O profago permanece em estado de latência, até ser ativado decorrente do estresse ou dano celular ao hospedeiro bacteriano. Além desses dois principais ciclos de replicação, os bacteriófagos também apresentam infecções crônicas e pseudolisogenia. Na infecção crônica ocorre liberação constantemente de novas partículas virais da célula hospedeira por brotamento ou extrusão sem que ocorra a lise celular, e na infecção pseudolisogênica, os fagos estão presentes no interior da célula na forma semelhante a um plasmídeo (Weinbauer, 2004; Madigan et al., 2008; Harada, L. K. et al., 2018; Maciejewska et al., 2018).

Figura 4: Esquema dos tipos de ciclos de vida viral.



Fonte: (Weinbauer, 2004).

A interação entre fagos-hospedeiro promove a co-evolução de ambas espécies. As células bacterianas desenvolveram sistemas para se defender contra os ataques dos bacteriófagos, da mesma forma, os vírus desenvolveram mecanismo que permite se adaptarem os novos sistemas das células. Os sistemas de defesa bacteriano atualmente descritos são: o bloqueio da entrada do DNA do fago e o segundo mecanismo envolve a degradação do material genético estranho. O primeiro sistema, incluem modificação da estrutura do receptor de adsorção viral, via mutação ou ocultação dos receptores dos fagos por várias proteínas, matriz extracelular ou inibidores competitivos, isso impede o reconhecimento pelo vírus. Se o primeiro sistema falhar, e a entrada do material genético viral ocorrer, o segundo sistema de proteção constituído de endonucleases têm a capacidade de clivar o DNA invasor, impedindo o progresso da infecção viral. Quando esses mecanismos falham, a infecção abortiva é acionada e desencadeia o suicídio de células bacterianas infectadas, resultando na prevenção da replicação de fagos, protegendo a população bacteriana adjacente (Golais, František et al., 2013; Shabbir, M. a. B. et al., 2016).

As bactérias evoluíram para escaparem da infecção viral, no entanto, alguns bacteriófagos produzem depolimerases, hidrolases e proteínas líticas capazes de degradar os compostos poliméricos que constituem a matriz do biofilme, diminuindo a estabilidade do biofilme, possibilitando um maior acesso dos bacteriófagos aos receptores celulares presentes na superfície bacteriana, inicialmente inacessíveis, além disso, as bactérias ficam mais susceptíveis a ação de antibióticos e de outros agentes antimicrobianos, como os biocidas químicos utilizados no controle e prevenção dos biofilmes. Assim, muitos bacteriófagos podem ser utilizados no biocontrole dos biofilmes sem a necessidade de serem capazes de infectar as células bacterianas presentes (Latka et al., 2017; Abdelkader et al., 2019).

2.6. Utilização de bacteriófagos na prevenção e controle de biofilme

A fagoterapia tem sido proposta como um método alternativo no controle dos biofilmes bacterianos (Lu e Collins, 2007). Os fagos podem interferir no processo de formação e na estabilidade do biofilme, através de enzimas depolimerases presentes nas fibrilas ou na cauda, ou liberada durante o processo de lise celular, sendo capazes de degradar a matriz do biofilme, permitindo o acesso do receptor do fago ao anti-receptor na membrana da bactéria hospedeira (Born et al., 2011; Buttimer et al., 2017).

A implantação da fagoterapia como controle biológico na formação e prevenção do biofilme apresenta várias vantagens em relação ao uso de antimicrobianos químicos. Os bacteriófagos ocorrem naturalmente no ambiente, os seres humanos estão expostos a eles diariamente sem qualquer dano, geralmente têm uma faixa estreita de hospedeiros, isso permite a criação de coquetéis de fagos, tendo alvos específicos dentro de um determinado gênero de bactérias. Após sua aplicação no ambiente, eles tendem a persistir em grande número, desde que o seu hospedeiro esteja presente e seja acessível (Buttimer et al., 2017).

O bacteriófago vB_EcoM-UFV13 foi obtido do sistema de esgotos de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, e propagado em *Escherichia coli* 30. Esse vírus possui um capsídeo com simetria icosaédrica e uma cauda contrátil, sendo um membro da família *Myoviridae* da ordem *Caudovirales*. Este fago apresentou atividade lítica contra *E. coli*, sendo uma vantagem, pois, pode ser rapidamente propagado, além de ser efetivo na prevenção do biofilme formado por *Trueperella pyogenes* como demonstrado por da Silva, et. al, 2018 . Análise do seu genoma verificou a capacidade genética do vB_EcoM-UFV13 em produzir VAPGHs com alto potencial de degradação da matriz extracelular presente nos biofilmes. Oito proteínas virais estruturais e uma proteína lítica foram destacadas como possíveis responsáveis pela

ruptura do biofilme de *T. pyogenes*, como mostrado na tabela 1. O que o qualifica tal fago como um promissor componente de coquetéis fágicos no controle do biofilme formado por BRS.

Diante dos problemas encontrados com controle do biofilme pelas técnicas atuais utilizadas nas indústrias de petróleo, e já sabendo do potencial do bacteriófagos vB_EcoM-UFV13 na prevenção de formação de biofilme (Da Silva Duarte, Vinícius et al., 2018). Um desempenho semelhante na prevenção de biofilme em oleodutos e reservatórios de petróleo, permitiria o uso desse fago como uma alternativa viável no controle de microrganismos e do biofilme associado ao processo de MIC em tais setores.

Tabela 1: Proteínas encontradas no bacteriófago vB_EcoM-UFV13 com domínio hidrolase. Número de acesso, quando disponível, é mostrado entre parênteses. Adaptado:

ORF	Características
31	Hidrolase de parede celular / autolisina
124	Peptidase (AIW13235.1)
153	Hidrolase de parede celular CwlJ
157	Proteína da família LD-carboxipeptidase
160	Família da N-acetilmuramol-L-alanina amidase
188	N-acetilmuramoil-L-alanina amidase CwlD (AIY73246.1)
245	Transglicosilase D mureína lítica ligada à membrana (AGE87472.1)
246	N-acetil-anidromuranil-L-alanina amidase (AGE87562.1)

Fonte: (Da Silva Duarte, Vinícius et al., 2018).

3. OBJETIVOS

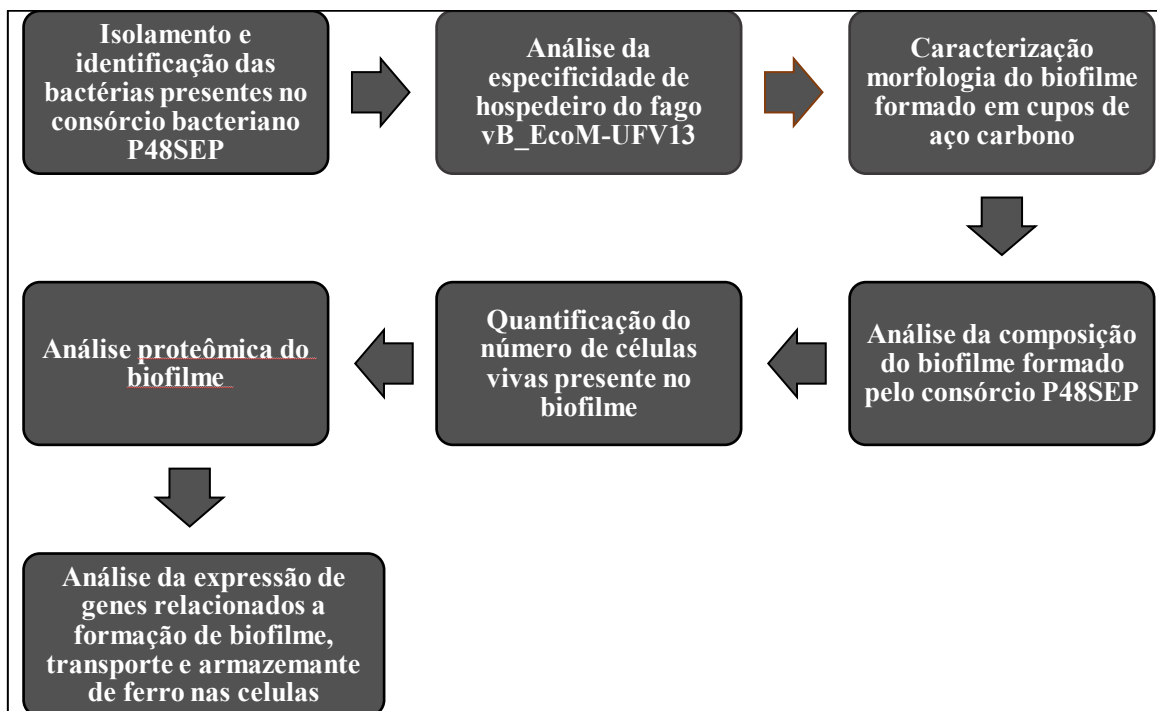
3.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial do bacteriófago vB_EcoM-UFV13 na prevenção e controle do biofilme formado pelo consórcio bacteriano P48SEP.

3.2. Objetivos específicos

- Isolar e identificar as bactérias presentes no consórcio bacteriano P48SEP;
- Avaliar o efeito da adição do fago vB_EcoM-UFV13 sobre a concentração dos principais constituintes do biofilme formado pelo consórcio bacteriano P48SEP;
- Caracterizar morfológicamente a matriz do biofilme tratado e não tratado pelo fago vB_EcoM-UFV13, por meio de microscopia eletrônica de varredura;
- Avaliar a viabilidade celular do biofilme antes e após os tratamentos com o fago vB_EcoM-UFV13;
- Determinar o perfil proteico na matriz do biofilme tratado e não tratado pelo fago vB_EcoM-UFV13;
- Avaliar a expressão de genes relacionados à formação de biofilme e resposta ao estresse nas bactérias presentes no consórcio P48SEP, quando exposto ao fago vB_EcoM-UFV13.

4. MATERIAL E MÉTODOS



4.1. Cultivo do consórcio bacteriano

Para as análises de formação de biofilme foi utilizado o consórcio bacteriano P48SEP obtido a partir de uma amostra de separador de produção de uma plataforma de extração de petróleo na Bacia de Campos, Rio de Janeiro. O consórcio foi inoculado em meio Postgate C modificado (ausência de FeSO_4) (25 g/L de NaCl, 0,5 g/L KH_2PO_4 , 1 g/L de NH_4Cl , 4,5 g/L de Na_2SO_4 , 0,04 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,064 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g/L de extrato de levedura, 0,3 g/L de citrato de sódio, 9,4 mL de lactato de sódio 50% (m/v), 4,0 mL/L de resazurina 0,025% (m/v) e 0,13 g/L de tioglicolato de sódio) e incubado em anaerobiose a 30 °C. O crescimento bacteriano foi realizado em tubos do tipo Hungate, com a leitura da densidade óptica em comprimento de onda de 600 nm (D.O._{600}), utilizando o espectrofotômetro (HACH) (Postgate, 1979).

4.2. Isolamento e identificação bacteriana

4.2.1. Isolamento bacteriano

Trabalhos anteriores do laboratório de Imunovirologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa determinaram o principal microrganismo presente no consórcio bacteriano P48SEP, a cepa *Desulfovibrio marinus* P48SEP, porém a segunda espécie ainda não tinha sido isolada e identificada. No entanto já tínhamos conhecimento que se tratava de um organismo

anaeróbico e com baixo conteúdo C + G em seu genoma, podendo se tratar de um organismo termofílico.

Para o isolamento foi utilizada cultura mista P48SEP, incubada a 80 °C por 20 minutos e posteriormente resfriada e transferida uma alíquota com auxílio de uma seringa para um tubo Hungate contendo meio Postgate C e incubado anaerobicamente a 30 °C por 72 horas. A espécie *D. marinus* é um organismo mesófilo, apresentando crescimento entre 20–50 °C, assim, ao aquecer a cultura mista a 80 °C eliminou a principal bactéria consistente do consórcio, possibilitando o isolamento da segunda espécie (Dhia Thabet et al., 2007).

4.2.2. Identificação e análise filogenética do gene RNAr 16S

O DNA do isolado bacteriano foi extraído como descrito por Pospiech & Neumann (1995). Após a etapa de extração, a concentração e a pureza do DNA foram estimadas em espectrofotômetro Nanodrop® ND-2000 (Thermo Scientific™) a 260 nm, em seguida o material genético foi submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os primers 10f e 1100r (Lane, 1991), tais oligonucleotídeos são complementares às regiões conservadas do gene que codifica a subunidade 16S do RNAr presente no Domínio Bacteria. Em seguida, os fragmentos amplificados pela PCR foram purificados utilizando o kit Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Wisconsin, USA) seguindo as recomendações do fabricante e enviados para o sequenciado. A sequência obtida pelo sequenciamento foi comparada com sequências já depositadas no banco de dados *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando a plataforma BLASTn. As sequências foram alinhadas utilizando o programa CLUSTALW (Thompson et al., 1997) e analisadas com o *software* MEGA 7.0.18 (Tamura et al., 2007). Posteriormente, foi realizada a construção de uma árvore filogenética pelo teste *Neighbor-Joining*, com simulação de 1.000 *bootstrap*.

4.3. Propagação de bacteriófago

4.3.1. Estoque *E. coli*

Foi utilizada a cepa *Escherichia coli* 30, a qual faz parte do acervo de microrganismos do Laboratório de Imunovirologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa, para a propagação viral. A cepa *E. coli* 30 foi estriada em placas contendo meio Luria-Bertani (LB - peptona 1%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 1% e ágar 1,5%) pH 7,0 e incubada a 37 °C. As colônias isoladas foram incubadas em meio LB líquido a 37 °C e 180 rpm até atingirem D.O.₆₀₀ igual a 0,7 (fase log) (Sambrook et al., 1989). Este estoque bacteriano foi utilizado nos ensaios

posteriores de propagação viral. A suspensão bacteriana utilizada foi estocada em glicerol 50% e mantida a -20 °C.

4.3.2. Propagação do fago vB_EcoM-UFV13

O fago vB_EcoM-UFV13 pertence à coleção de vírus bacterianos do Laboratório de Imunovirologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa. Aliquotas de 100 µL da suspensão do fago foram adicionadas a 900 µL de cultura *E. coli* 30 D.O.₆₀₀ igual a 0,7. Em seguida, foram acrescentados 6 mL de LB semissólido (LB acrescido de ágar bacteriológico na concentração de 0,7%), fundido a 55 °C. Após realizar a homogeneização, a mistura resultante foi vertida em placa de Petri já contendo LB sólido. Após a solidificação à temperatura ambiente, as placas foram incubadas por 12 horas a 37 °C. Após a identificação de placas de lise, foram adicionados em cada placa 5 mL de tampão SM (5,8 g/L de NaCl, 2 g/L de MgSO₄, 6 g/L de tris(hidrometil)aminometano e 0,1g/L de gelatina) pH 7,5, deixando as placas agitando por 4 horas a 4 °C. Após esse período, o sobrenadante foi recuperado e a ele adicionado clorofórmio 10 % (v/v) e NaCl 1 M, com o intuito de lisar as bactérias e dissociar os fagos ainda associados aos restos celulares. A mistura foi homogeneizada e mantida por 1 hora em repouso em temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada uma centrifugação a 6000 x g, por 20 minutos à 4 °C para sedimentação de restos celulares e separação de fases. A fase aquosa foi removida, esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm (Millipore, Billerica, MA, USA) e transferida para novos tubos esterilizados, sendo armazenados a 4 °C (Sambrook et al., 1989).

4.3.3. Titulação de bacteriófagos

A fim de avaliar o sucesso da técnica de propagação dos bacteriófagos e a viabilidade dos mesmos, foi realizada diluição seriada da suspensão viral em tampão SM (Sambrook et al., 2008), e as diluições foram plaqueadas conforme descrito no item 4.3.2. Após o período de incubação, as placas de Petri que apresentaram um número de placas de lise entre 30 e 300 foram consideradas para contagem. O título viral foi expresso em unidade formadora de placa de lise/mL (UFP/mL) de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{UFP/mL} = (\text{N}^\circ \text{ de placas de lise} \times \text{fator de diluição}) / \text{volume da alíquota plaqueada (mL)}$$

Para avaliar a possível ação bactericida do bacteriófago vB_EcoM-UFV13 e qual seria a melhor concentração de fago capaz de prevenir a formação de biofilme desenvolvido pelo consórcio P48SEP, diferentes concentrações do fago foram avaliadas em todos os experimentos,

sendo o primeiro tratamento com baixa concentração de fago 10^4 UFP/mL, o segundo tratamento com média concentração 10^8 UFP/mL e o terceiro tratamento alta concentração 10^{12} UFP/mL.

4.4. Análise da especificidade de hospedeiros do fago vB_EcoM-UFV13

De modo a avaliar se o fago vB_EcoM-UFV13 seria capaz de infectar as bactérias presentes no consórcio bacteriano P48SEP, foi realizado o monitoramento do crescimento por meio da determinação da densidade óptica a 600 nm ($D.O_{600}$), utilizando o espectrofotômetro (HACH), durante 15 dias em anaerobiose a 30 °C. Foram utilizados tubos Hungate[®] contendo 9 mL de meio Postagate C modificado e o inóculo ativo numa $D.O_{600}$ inicial igual a 0,1. Em seguida foi feita a inoculação do vírus, variando a concentração final de bacteriófago vB_EcoM-UFV13 de acordo com o tratamento (baixa, média e alta concentração de fago). Frascos contendo apenas o inóculo bacteriano foi utilizado como controle. Os tratamentos foram feitos em triplicata.

4.5. Análise da morfologia do biofilme em cupons de aço carbono

4.5.1. Preparo dos cupons de aço carbono

Para avaliar a influência do vírus na formação do biofilme, foram utilizados dois cupons de aço carbono com tamanhos diferentes para os experimentos. O primeiro modelo de cupom foi utilizado para a análise morfológica do biofilme com as seguintes dimensões: 1 cm² (10 mm de comprimento, 10 mm de largura e 1 mm de espessura), já o segundo foi recortado em formato retangular com área de 6 cm²: 60 mm de comprimento, 10 mm de largura e 1 mm de espessura. Numa das extremidades dos cupons foi feito um furo por onde os cupons foram suspensos por um fio de náilon. Antes de cada ensaio, os cupons foram polidos com jateamento de areia, para remoção de incrustações e obtenção de um perfil de rugosidade adequado e homogêneo. Após esta etapa os cupons foram esterilizados por radiação ultravioleta por 30 minutos em cada lado do cupom.

4.5.2. Microscopia eletrônica de varredura

Buscando avaliar a formação do biofilme pelo consórcio P48SEP, um sistema foi montado em frascos de 30 mL (figura suplementar S1), utilizando cupons de aço carbono, nas dimensões de 1cm² suspenso por um fio de náilon, contendo 9 mL de meio Postagate C modificado, sendo inoculado o consórcio bacteriano numa $D.O_{600}$ final igual a 0,1. Em seguida,

foi feita a inoculação do vírus, variando a concentração final de bacteriófago de acordo com o tratamento. Frascos contendo apenas o consórcio bacteriano foi utilizado como controle. Os frascos foram acondicionados em anaerobiose a 30 °C e por 15 dias, todo o experimento foi realizado em triplicata (Sharma et al., 2018).

Os cupons contendo o biofilme foram lavados 3 vezes por imersão em PBS 1 X (NaCl 0,13 M, KCl 2 mM, Na₂HPO₄ 9 mM, KH₂PO₄ 1 mM) pH 7,4, para a remoção de células planctônicas e fixados em paraformaldeído 3,7 % (v/v) em tampão PBS 1 X, à temperatura ambiente por 12 horas. Após esse período os cupons foram novamente lavados em tampão PBS e submetidos à desidratação em série etanólica crescente (30 a 100 % v/v) por 10 minutos cada, a temperatura ambiente. A desidratação em etanol 100 % foi repetida 3 vezes, com objetivo de obter a retirada máxima de água. Em seguida, os cupons foram submetidos à secagem no ponto crítico (Critical Point Dryer - CPD[®], Bal-tec, modelo 030). Após a etapa de secagem, os cupons foram fixados em porta-espécimes (stubs) com fita dupla face e cobertos com ouro no metalizador (Sputtercoater, Balzers, modelo FDU010). Ao final deste procedimento, os cupons foram examinados no Microscópio Eletrônico de Varredura Leo 1430 VP no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa, operando a 20 kV para a obtenção das imagens (Wang et al., 2012).

4.6. Análise da composição do biofilme

4.6.1. Extração de EPS

Para análise da composição do biofilme formado, sistemas maiores foram montados (Figura suplementar S2), utilizando cupom de aço carbono com 6 cm² de área, suspenso por um fio de náilon, imersos em frascos de 100 mL, contendo 80 mL de meio Postgate C modificado, sendo inoculado o consórcio bacteriano numa D.O.₆₀₀ final igual a 0,1 e alíquotas do fago com as respectivas concentrações 10⁴, 10⁸ e 10¹² UFP/mL. Os frascos foram acondicionados em anaerobiose a 30 °C por 15 dias, todo experimento foi realizado em triplicata. Os cupons, formam lavados por imersão em PBS, os biofilmes formados foram raspados com auxílio de uma espátula esterilizada e suspensos em tampão. Para extração dos EPS, foi utilizado o método de extração por EDTA, adicionando 1 mL de solução de EDTA 2 % (m/v) para cada 1 mL de suspensão de biofilme. A mistura foi mantida em agitação por 12 horas a 4 °C. Após esse período as amostras foram filtradas em membrana de 0,22 µm e dialisadas contra água deionizada, utilizando membrana de diálise 3,5 kDa (Spectra/Por[®]), duas vezes de 1 hora cada e uma vez durante 12 horas (Jachlewski et al., 2015).

4.6.2. Quantificação de carboidrato

A concentração de carboidrato nos biofilmes foi determinada pelo método fenol-ácido sulfúrico de acordo com (Dubois et al., 1956). Os teores de açúcares totais foram determinados por espectrofotometria num comprimento de onda igual a 490 nm, utilizando uma curva padrão de D-glicose de intervalo de 10 a 70 mg/L.

4.6.3. Quantificação de proteína

Para determinação da concentração de proteína nas suspensões, foi utilizado o método do ácido bicinonínico (BCA) usando kits comerciais (Thermo Fisher Scientific) e albumina de soro bovino como padrão no intervalo de concentração de 0 – 1000 µg/mL, seguindo as recomendações do fabricante (Jachlewski et al., 2015).

4.6.4. Quantificação de DNA

O DNA extracelular presente nos biofilmes foi quantificado utilizando o kit de reagente Qubit dsDNA BR (Invitrogen, Molecular Probes) e o DNA-λ foi utilizado para construção da curva padrão. A medição foi realizada com um fluorímetro (Qubit 4 Fluorometer, Invitrogen) ajustado para o comprimento de onda de excitação de 480 nm e leituras de emissão a 520 nm, seguindo as recomendações do fabricante (Wang et al., 2012; Jachlewski et al., 2015).

4.7. Contagem celular

Para a quantificação do número de células vivas presente no biofilme, novos sistemas foram montados e incubados anaerobicamente a 30 °C por 15 dias para a formação do biofilme. Após esse período os cupons foram removidos e lavados em tampão fosfato pH 7,0 por imersão, posteriormente foram transferidos para Falcons® contendo PBS 1X acrescentado de iodeto de propídio (10 µg/mL) e FITC (2 µg/mL) e incubados por 5 minutos ao abrigo de luz, à temperatura ambiente. Após esse período, os cupons foram transferidos para novos tubos de 15 mL contendo solução de paraformaldeído 3,5 % (v/v) por 5 minutos para a fixação parcial do material. Após o processo de coloração e fixação os cupons foram lavados com tampão fosfato por imersão e submetidos ao banho ultrassom por 8 minutos, em seguida, a solução foi centrifugadas a 600 x g por 5 minutos para a precipitação dos produtos de corrosão, transferindo o sobrenadante para novos frascos protegidos da luz e imediatamente foi realizada a mensuração pelo citômetro de fluxo BD Accuri C6 (BIOSCIENCES).

4.8. Análise proteômica

As amostras do biofilme extraídas conforme o item 4.6.1 foram submetidas a liofilização e enviadas para empresa Genone, responsável pela extração e quantificação das proteínas, além de realização da digestão enzimática utilizando tripsina, injeção das amostras no LCMS - NanoUltra-HPLC ultimate 3000 e Quadrapolo-Orbitrap QExactive Plus Gradiente 65 minutos. Por fim, foi feita pela empresa contratada, a análise de bioinformática utilizando o software Proteome Discoverer (ThermoScientific) para a identificação das proteínas.

4.9. Análise de expressão gênica por PCR em tempo real

4.9.1. Seleção dos genes

Foram selecionados genes relacionados a formação de biofilme por *D. marinus* (proteínas de biossíntese de exopolissacarídeo e glicogênio sintase), além de genes envolvidos na captura, transporte e armazenamento de ferro nas células, (bacterioferritina e proteínas de transporte de ferro), para avaliar os níveis de expressão gênica dos microrganismos presente nos biofilmes formados nos diferentes tratamentos, utilizando o fago vB_EcoM-UFV13, confrontando os resultados com o controle. Foi utilizado como controle endógeno o gene da *girase A*.

4.9.2. Síntese dos primers

O par de primer da *girase A* foi sintetizado de acordo com Crispim, et al. (2019) (2019). Os demais primers utilizados para análise da expressão gênica foram desenhados utilizando o Primer Express Software 3.0 (Thermo Scientific™) baseado na sequência genômica da *D. marinus* depositado no *GeneBank* (DDBJ/ENA/GeneBank) sob número de acesso QMIF00000000. Todos os conjuntos de primers foram testadas usando o software Oligo Analyzer 1.0.2 e a especificidade foi estimada pela ferramenta Primer-BLAST. Os conjuntos de primers testados estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Primers usados na análise transcricional por PCR quantitativo em tempo real.

Gene	Nome do primer	Sequência (5' → 3')	Tamanho do amplicon (pb)
Proteína de biossíntese de exopolissacarídeo	PbpF PbpR	5'TTCGAGAGCCTGACGTATCC3' 5'TCCGGAAGTTCGCCTATCTC3'	53
Glicogênio sintase	GsF GsR	5'AAAGAAGATGAACCGCTCGC3' 5'GCCGCTTCTACTACAACACG3'	65
Glicosil transferase	GtF GtR	5'TTGATGATGTGGCGTTCGTC3' 5'CTTCAATGTGCTGCTAGGCC3'	114
Bacterioferritina	bfrF bfrR	5'TGCTCCTCGTCGATGATGTT3' 5'CACCATCTTCCCCTTCGACT3'	132
Proteínas de transporte de ferro B	feoBF feoBR	5'CAACCCCAACTTCACCATGG3' 5'CGTAGATCAGCACAAAGGCC3'	59

Fonte: A autora

4.9.3. Extração do RNA total

Após 15 dias de incubação em anaerobiose os biofilmes formados nos cupons como descrito no item 4.6.1 foram lavados em PBS 1X por imersão e raspados com auxílio de uma espátula, solubilizados em 3 mL de tampão e submetidos a banho de ultrassom por 8 minutos, para despredimento do biofilme. Em microtubos de 2,0 mL contendo 0,5 g de esferas de zircônio (0,1 mm de diâmetro) foi adicionado 1 mL de biofilme solubilizado juntamente com solução de SDS 20 % (m/v) e 0,7 mL de Trizol[®] (InvitrogenTM). Em seguida, foi realizada a lise mecânica no homogeneizador Bead Ruptor (Omni International) por 1 minuto. Os tubos foram incubados a 60 °C por 30 minutos e posteriormente foi realizada uma segunda lise mecânica nas mesmas condições e os tubos foram centrifugados a 12.000 xg a 4 °C durante 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para novos tubos contendo 250 µL de Trizol[®] e 250 µL de clorofórmio, sendo homogeneizados gentilmente e centrifugados a 12.000 x g por 5 minutos a 4 °C. Novamente a fase aquosa foi transferida para novo tubo, juntamente com 500 µL de clorofórmio, a solução foi homogeneizada e centrifugada a 12.000 x g por 5 minutos a 4 °C. A fase aquosa foi removida e transferida para novo tubo juntamente com 0,1 do volume de acetato de sódio 3 M e 0,6 do volume de isopropanol. A solução foi homogeneizada e armazenada a -20 °C por 12 horas. Após esse período a solução foi centrifugada a 12.000 x g por 20 minutos a 4 °C e o sobrenadante descartado. Os sedimentos foram lavados duas vezes com igual volume de etanol 70 % gelado e etanol absoluto. Os pellets foram secos ao ar e suspensos em 20 µL de água livre de RNase. O RNA extraído foi submetido a tratamento com DNase para eliminação de traços de DNA presentes na amostra. Para este procedimento foi utilizado o kit RQ1 Rnase-Free Dnase (Promega[®]), seguindo as recomendações do fabricante. A concentração e a pureza

do RNA foram estimadas em espectrofotômetro Nanodrop[®] ND-2000 (Thermo Scientific[™]) a 260 nm. A integridade do RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1 % em tampão TBE 1X corado com brometo de etídio e observado sob luz ultravioleta.

4.9.4. Síntese de cDNA

Para a síntese do cDNA foi realizada por meio do Kit GoScript (Promega, Madison, USA). Seguindo as recomendações do fabricante. A concentração e a pureza do cDNA foram estimados por espectrofotometria como descrito anteriormente. Após isso, o cDNA foi armazenado a -20 °C até o seu uso.

4.9.5. qPCR

Inicialmente foi realizada a padronização das reações de qPCR utilizando o SsoFast[™] EvaGreen[®] Supermix (BIO-RAD). O volume final da reação foi de 20 µL, contendo: 1X do supermix EvaGreen, o par de primers na concentração final de 200 nM e amostra de cDNA nas diferentes concentrações (5; 0,5; 0,05; 0,005 ng). Os ensaios foram realizados em duplicata no aparelho Eco[™] Real-Time PCR (Illumina[®]). Na reação de qPCR seguiu as seguintes condições: desnaturação à 95°C por 30 segundos, anelamento à 56°C por 60 segundos e alongação à 72°C por 60 segundos, em um total de 40 ciclos, usando os primers para o gene da DNA girase (*gyrA*). Em seguida foram analisados os 5 genes alvos (*Pbp*, *Gt*, *Gs*, *bfr* e *feoB*), nas mesmas condições acima, sendo utilizado 5 ng de cDNA/reação.

4.10. Análise estatística

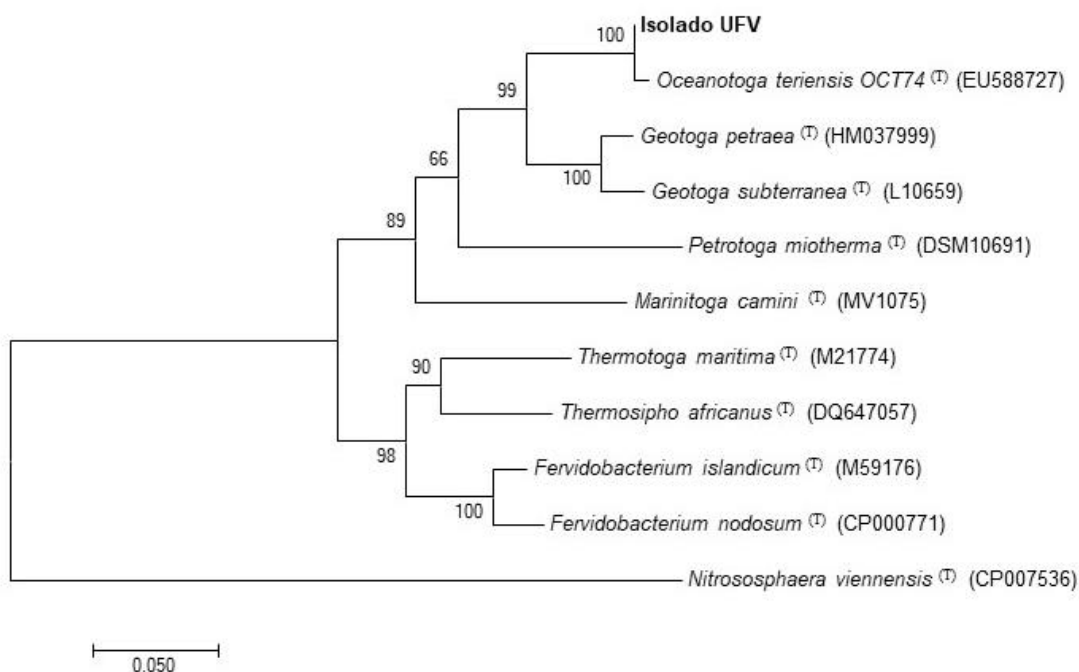
A análise estatística foi realizada com o programa GraphPad InStat 3 (GraphPad, La Jolla, CA, EUA), utilizando-se análise de variância one-way (ANOVA) com 95 % de acurácia para avaliar as diferenças entre o controle e os diferentes tratamentos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Identificação e análise filogenética utilizando o gene RNAr 16S

O isolado obtido a partir consórcio P48SEP apresentou 100% de cobertura e 99 % de identidade com *Oceanotoga teriensis* OCT74 (número de acesso EU588727). Como mostrado na figura 5, a análise filogenética utilizando-se o gene RNAr 16S confirma a identificação taxonômica do isolado deste estudo.

Figura 5: Árvore filogenética baseada na sequência parcial do gene RNAr 16S do isolado bacteriano e as demais sequências escolhidas. A árvore foi construída utilizando o método *Neighbor-Joining* com valor de *Bootstrap* representado nos ramos referentes a 1000 replicações. O número de acesso das sequências no *GenBank* é apresentado entre parênteses.



Fonte: A autora.

Ao analisar a árvore filogenética é possível verificar que o isolado se agrupou com a sequência da espécie *O. teriensis* nas 1000 vezes que a árvore foi montada.

Assim, podemos concluir que o consórcio bacteriano P48SEP, isolado de água de produção da plataforma P48 da Petrobras é constituído pela espécie *D. marinus*, um representante do grupo das bactérias redutoras de sulfato (BRS) e a espécie *O. teriensis*.

A espécie *Oceanotoga teriensis* (OCT74^T) foi inicialmente caracterizada a partir de um isolado obtido através de amostras de fluido de formação recolhidas de poços produtores de petróleo em alto mar, em 2011. *O. teriensis* é uma bactéria anaeróbia, quimiorganotrófica capaz de crescer em diferentes fontes de carbono, Gram-negativa, em forma de bastonete e com múltiplos flagelos. Apresenta a capacidade de reduzir o tiosulfato e o enxofre elementar a sulfeto de hidrogênio (Jayasinghearachchi e Lal, 2011).

5.2. Análise da especificidade do fago vB_EcoM-UFV13

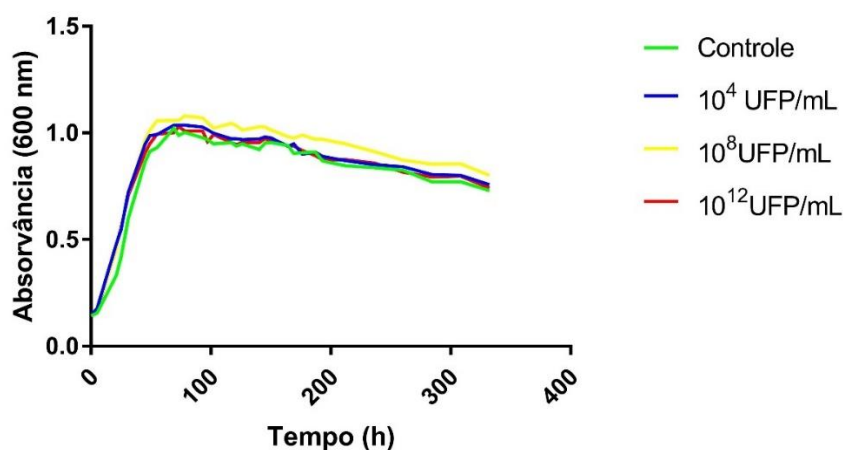
O método mais convencional para avaliar a atividade lítica de um fago é o ensaio em placa de Petri com meio de cultivo, porém essa técnica é trabalhosa e demorada. Uma alternativa para avaliar a atividade lítica de forma indireta é o acompanhamento da densidade óptica. O monitoramento da turbidez tem a vantagem por ser rápida e não destruir a amostra (Maia et al., 2016). O acompanhamento do crescimento bacteriano fornece informações importantes sobre a fisiologia celular, como características nutricionais e energética, além de possibilitar a compreensão das condições de sobrevivência e proliferação sob diferentes condições (Flickinger, 2010).

A redução na densidade óptica da cultura bacteriana na presença de fago lítico é indício de infecção viral, devido à lise celular, já a presença de fagos lisogênicos pode alterar características metabólicas, morfológicas e/ou fisiológicas das bactérias, por meio da interrupção de genes bacterianos ocasionada pela integração do profago no genoma bacteriano (Brussow et al., 2004). No intuito de determinar se as bactérias presentes no consórcio P48SEP são hospedeiras para o fago vB_EcoM-UFV13 foi realizado o monitoramento da D.O.₆₀₀ durante 15 dias. Inicialmente, foi realizado o monitoramento do crescimento do isolado *O. teriensis* na ausência (controle) e presença do vírus em diferentes concentrações (tratamentos) (figura 6). Não ocorreu nenhuma alteração no crescimento bacteriano na presença do fago nas três diferentes concentrações avaliadas quando comparado ao controle, portanto o fago vB_EcoM-UFV13 nas condições testadas não foi capaz de infectar a espécie *O. teriensis*, bactéria presente no consórcio P48SEP.

Para analisar a ação do fago vB_EcoM-UFV13 sobre a segunda espécie presente no consórcio P48SEP (*D. marinus*), foi realizado o monitoramento da densidade óptica do consórcio (figura 7), uma vez que já se sabe que nas condições analisadas o fago não promoveu nenhuma alteração no crescimento de *O. teriensis*. Novamente não foi observado alteração na D.O.₆₀₀ da suspensão nos tratamentos com baixa e média concentração de fago durante o

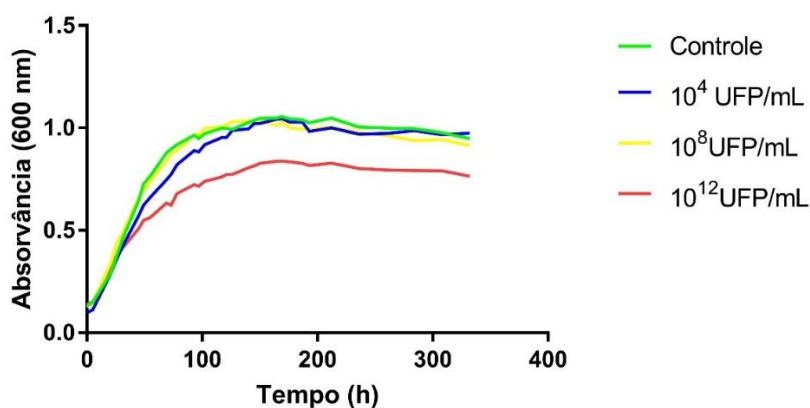
período de análise, comparado ao controle. No entanto, o tratamento 10^{12} UFP/mL apresentou uma redução na velocidade de crescimento, além de mante-se na fase estacionária numa D.O.₆₀₀ inferior ao controle. Nas condições analisadas a alta concentração de fago foi capaz de alterar o crescimento bacteriano do consórcio P48SEP, porém, são necessários estudos futuros para a investigação se realmente o fago analisado tem a capacidade de infectar a *D. marinus*.

Figura 6: Cinética de crescimento da *Oceanotoga teriensis* nas diferentes concentrações do fago na ausência (controle) e na presença de fago vB_EcoM-UFV13 nas concentrações de 10^4 (azul), 10^8 (amarelo) e 10^{12} (vermelho) UFP/mL.



Fonte: A autora.

Figura 7: Cinética de crescimento do consórcio bacteriano P48SEP nas diferentes concentrações do fago na ausência (controle) e na presença de fago vB_EcoM-UFV13 nas concentrações de 10^4 (azul), 10^8 (amarelo) e 10^{12} (vermelho) UFP/mL.

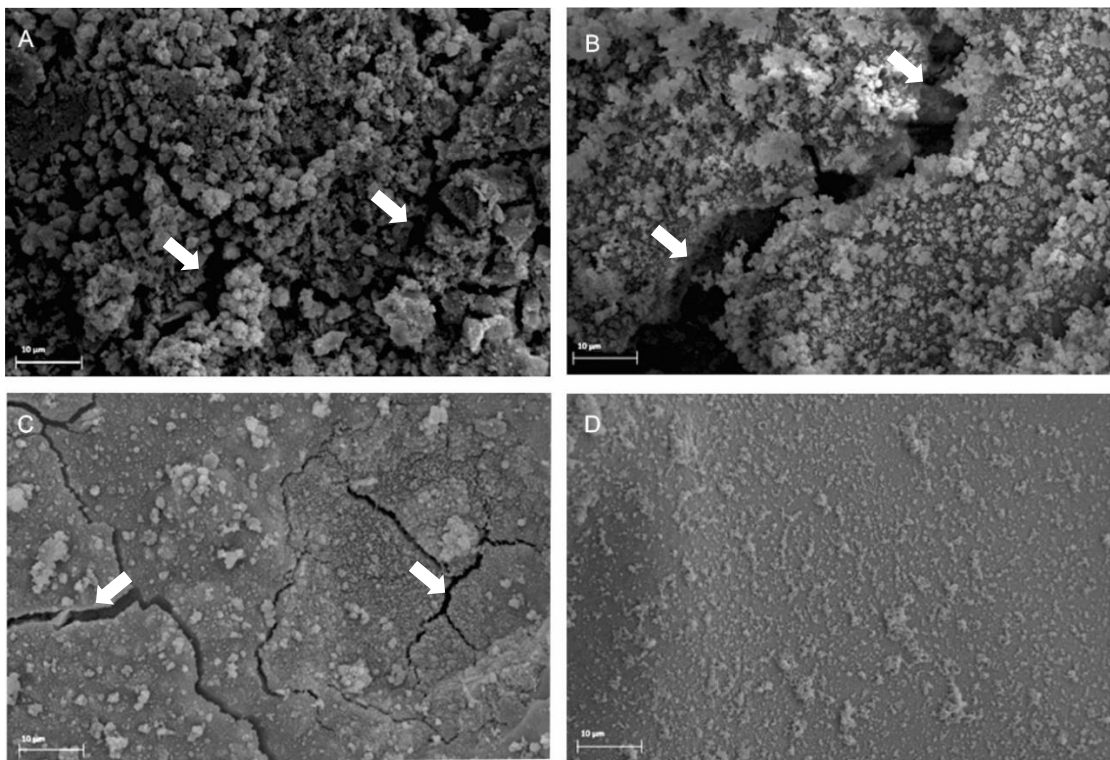


Fonte: A autora.

5.3. Análise da morfologia do biofilme em cupons de aço carbono

Com o objetivo de avaliar a influência do fago vB_EcoM-UFV13 na morfologia do biofilme, foram obtidas micrografias por microscopia eletrônica de varredura (MEV) do biofilme formado na superfície dos cupons de aço carbono (figura 8).

Figura 8: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos biofilmes formado pelo consórcio bacteriano na superfície de aço carbono na presença do bacteriófago vB_EcoM-UFV13 e na ausência dos mesmos (controle) no aumento de 3500 x. Setas brancas mostram o surgimento de rachaduras na superfície do metal. A) ausência do fago (controle), e presença do fago na concentração de B) 10^4 ; C) 10^8 ; D) 10^{12} UFP/mL.



Fonte: A autora.

O biofilme formado na ausência do vírus, possui uma grande quantidade de material extracelular na superfície do cupom, havendo a formação de um biofilme denso. No entanto, os tratamentos com média e alta concentração de fago, foram efetivos na diminuição na espessura do biofilme. Na presença de apenas 10^4 UFP/mL (Figura 8 B) houve uma redução no biofilme, porém menos expressiva em relação aos outros tratamentos, sendo possível observar uma aglomeração de matriz extracelular, no entanto menos acentuada que o controle. Resultados

semelhantes formam relatados em biofilmes formados por *T. pyogenes* utilizando o fago vB_EcoM-UFV13 (Da Silva Duarte, V. et al., 2018).

Além disso, é possível verificar através das micrografias a presença de rachaduras na superfície dos cupons de aço no controle e nos tratamentos com 10^4 e 10^8 UFP/ml de fago, como indicado pelas setas. O craqueamento ocorre quando o aço é exposto a um ambiente ácido, decorrente ao excesso de H_2S , assim, a reação de recombinação dos átomos de hidrogênio à hidrogênio molecular é retardada, conseqüentemente permite que os átomos de hidrogênio se difundam no interior do aço, levando a formação de rachaduras no metal (Park et al., 2008). No entanto o tratamento com alta concentração de fago foi efetivo para impedir o surgimento de fendas na superfície metálicas, provavelmente devido a diminuição do biofilme na superfície do cupom.

5.4. Análise da composição do biofilme

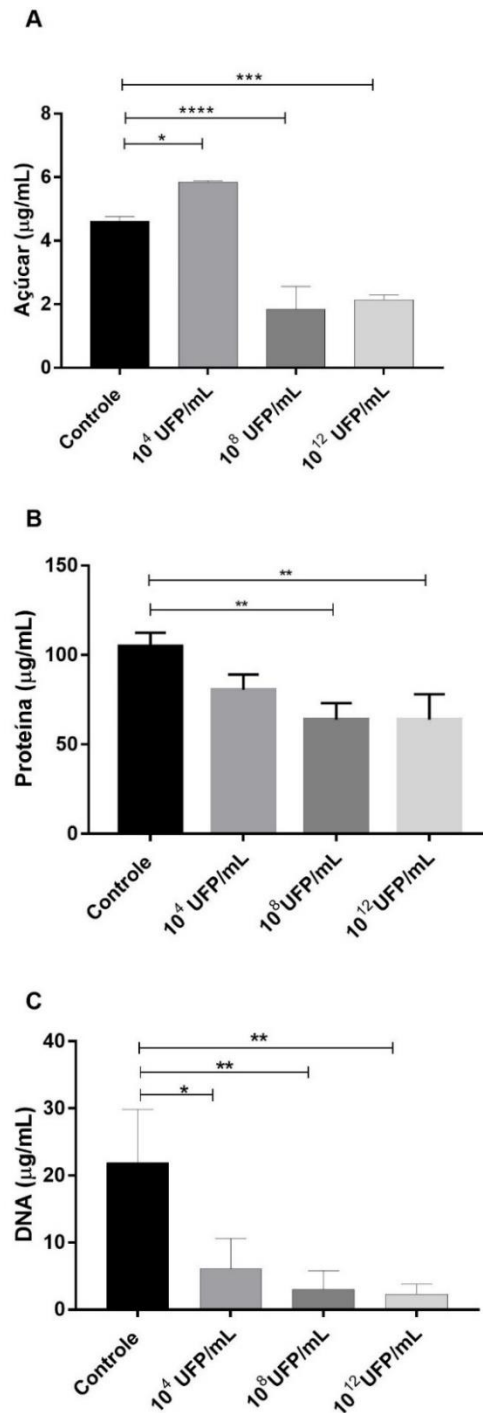
Dada a importância dos três principais componentes da matriz dos biofilmes bacterianos, a variação do teor de polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular no biofilme formam quantificados. Houve uma diminuição significativa na concentração de carboidratos e proteínas nos biofilmes formados na presença do fago nas concentrações de 10^8 e 10^{12} UFP/mL, mas não de 10^4 UFP/mL (figura 9). Pelo contrário, nesta concentração ocorreu aumento da concentração de carboidratos nessa matriz. Já a quantificação de DNA extracelular mostrou uma redução significativa nos diferentes tratamentos (figura 9 C).

Os polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular presente na matriz do biofilme fornecer diversos benefícios para os organismos presentes naquele ambiente, incluindo proteção, além de facilitar o processo de adesão às superfícies. Além disso, a matriz extracelular que envolve os microrganismos fornecem proteção contra os agentes antimicrobianos (Whitchurch et al., 2002; Fong e Yildiz, 2015; Limoli et al., 2015).

No item anterior, foi possível observar uma diminuição na formação do biofilme nos tratamentos com média e alta concentração de fago, provavelmente devido a diminuição dos principais componentes responsáveis pela adesão, estabilidade e proteção do biofilme, demonstram que o fago vB_EcoM-UFV13 nas concentrações 10^8 e 10^{12} UFP/mL é capaz de interferiu negativamente na formação do biofilme. Baseado no número elevado de VAPGHs encontrados no genoma desse vírus (tabela 1), este vírus interfere na formação de biofilme degradando os componentes da parede celular das bactérias presente no consórcio P48SEP e/ou

as substâncias poliméricas extracelulares de biofilme, como já observado em trabalhos anteriores (Da Silva Duarte, Vinícius et al., 2018).

Figura 9: Concentração de açúcar, proteína e DNA nos biofilmes formados em cupons de aço carbono na ausência de fago (controle) ou na presença do fago vB_EcoM-UFV13 nas concentrações de 10^4 , 10^8 ou 10^{12} UFP/mL. Barras representam o desvio padrão. Diferenças estatisticamente obtidas quando comparadas ao controle (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$), (n=3).



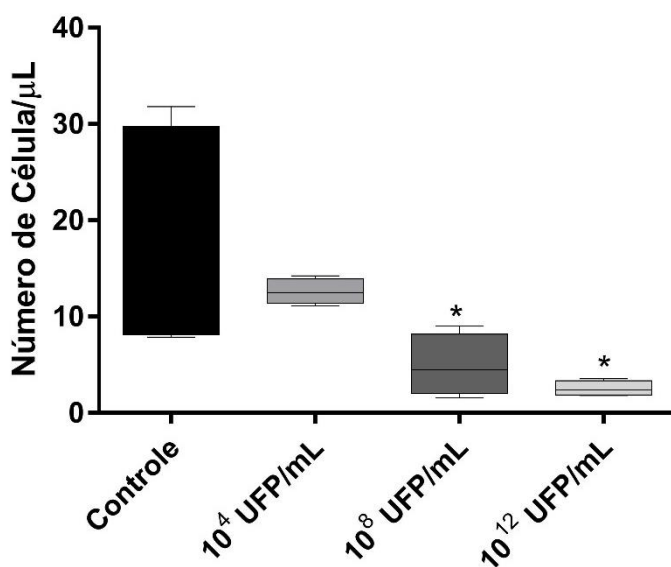
Fonte: A autora.

A baixa carga viral (tratamento 10^4 UFP/mL) provavelmente foi capaz de desencadear uma resposta adaptativa a ação do fago. As células reconhecem os vírus como um agente estranho e são capazes de desenvolver vários mecanismos de bloqueio da adsorção para evitar a infecção viral, por exemplo, mascarando receptores de fagos aumentando a concentração de polissacarídeo na superfície bacteriana (Shabbir, M. A. et al., 2016), isso explicaria o aumento observado na quantificação de açúcar no tratamento com baixa concentração de fago.

5.5. Contagem celular

Com o objetivo de avaliar o número de células viáveis nos biofilmes tratados com as três diferentes concentrações do fago vB_EcoM-UFV13, foi realizada a citometria de fluxo (figura 10).

Figura 10: Presença de células viáveis nos biofilmes formados pelo consórcio bacteriano P48SEP em cupons de aço carbono na ausência de fago (controle) ou na presença do fago vB_EcoM-UFV13 nas concentrações de 10^4 , 10^8 ou 10^{12} UFP/mL. Barras de erro representam o desvio padrão. Diferenças estatisticamente obtidas quando comparadas ao controle (* $P < 0,05$), (n = 3).



Fonte: A autora.

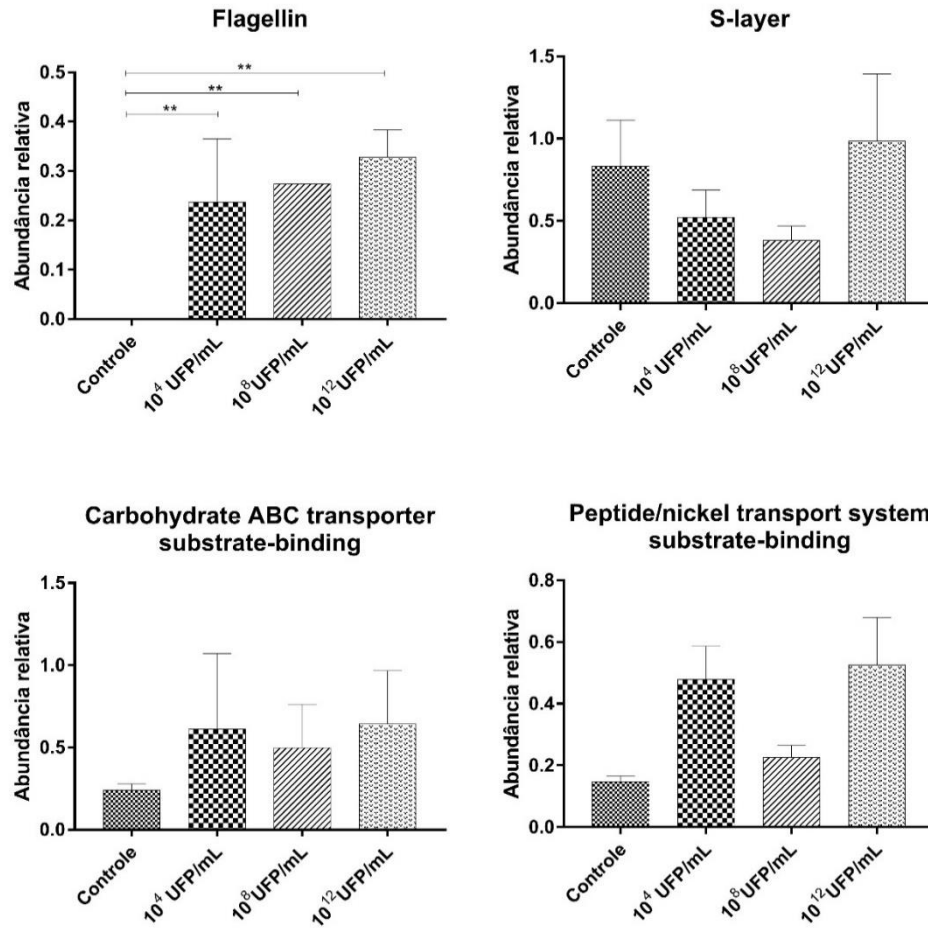
Houve diminuição no número de células aderidas à superfície dos cupons na presença do fago nas concentrações de 10^8 ou 10^{12} UFP/mL (figura 10), quando comparado ao controle. Isto ocorreu provavelmente devido a diminuição dos principais componentes presente na matriz extracelular do biofilme (açúcar, proteína e DNA) que potencializam o processo de adesão em diferentes superfícies, como visto na figura 9, o que demonstra que o fago vB_EcoM-UFV13, em média e alta concentração, é capaz de reduzir o número de células aderidas ao cupom de aço carbono. A diminuição no número de células viáveis refletiu na redução na formação do biofilme produzido pelo consórcio P48SEP, considera a prevenção da formação do biofilme como ponto importante no controle da biocorrosão em oleodutos e tanques de armazenamento de petróleo (Muszanska et al., 2012).

5.6. Análise proteômica

A análise proteômica foi realizada a partir de amostras do biofilme tratado como diferentes concentrações do fago vB_EcoM-UFV13 e não tratado (controle), no intuito de avaliar possíveis alterações na composição proteica na matriz extracelular que constitui o biofilme.

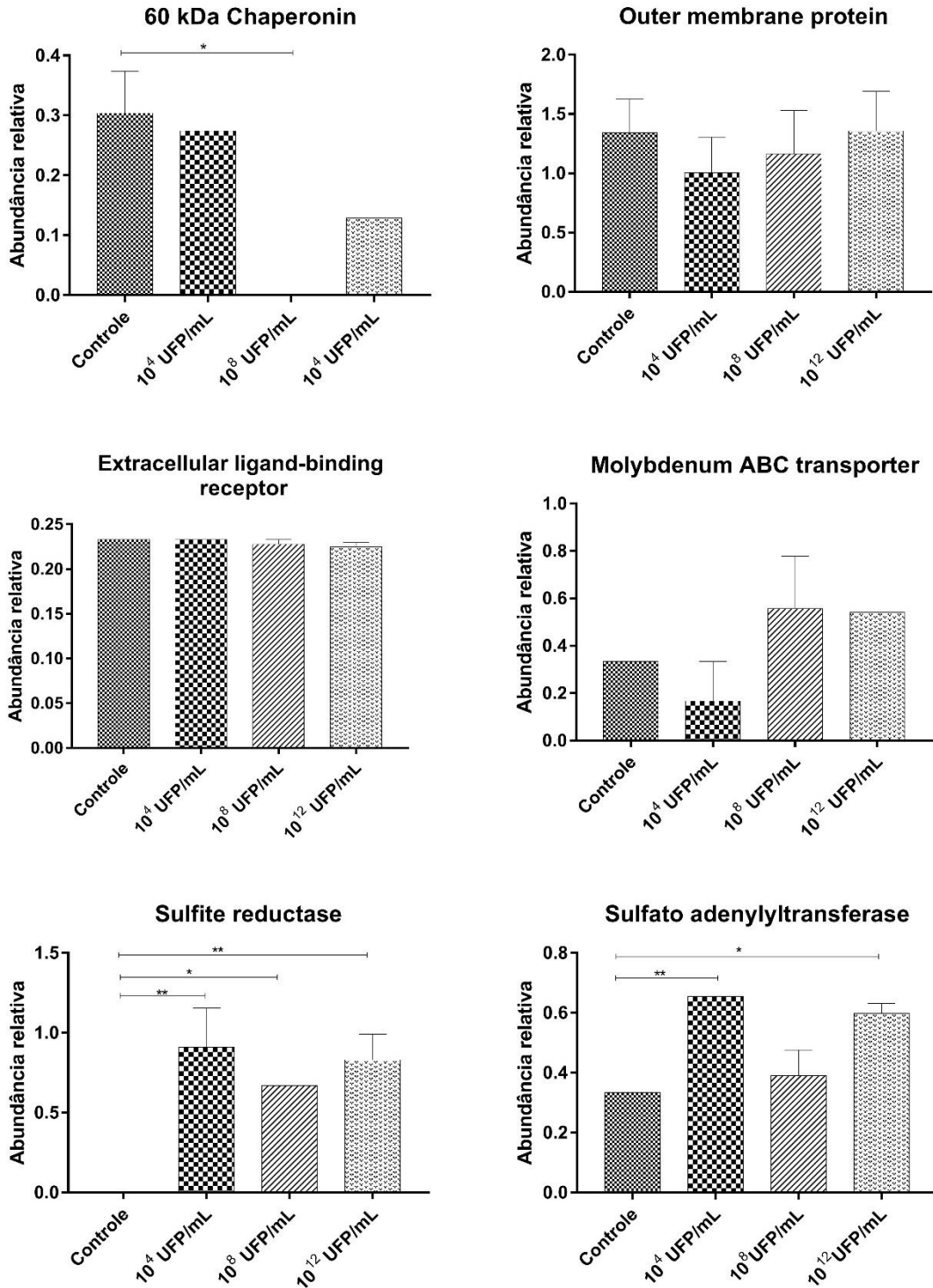
Um total de 183 proteínas foram detectadas de ambas espécies presente no consórcio P48SEP (tabela suplementar S1), no entanto, um conjunto de 10 de proteínas relacionadas à formação do biofilme e possível resposta celular ao estresse foram selecionadas, sendo 4 proteínas referentes à espécie *O. terienseis* e 6 proteínas pertencentes à espécie *D. marinus* (figuras 11 e 12).

Figura 11: Abundância relativa das proteínas da espécie *Oceanotoga teriensis* no biofilme. Os valores observados no eixo Y são referentes ao *Exponentially Modified Protein Abundance Index* (emPAI), o qual oferece quantificação relativa aproximada. Diferenças estaticamente obtidas quando comparadas ao controle (** P < 0,01), (n = 3).



Fonte: A autora.

Figura 12: Abundância relativa das proteínas da espécie *Desulfovibrio marinus* no biofilme. Os valores observados no eixo Y são referentes ao *Exponentially Modified Protein Abundance Index* (emPAI), o qual oferece quantificação relativa aproximada. Diferenças estaticamente obtidas quando comparadas ao controle (* P < 0,05, ** P < 0,01), (n = 3).



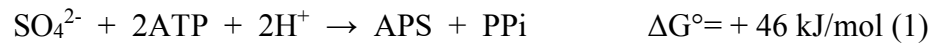
Fonte: A autora.

Algumas proteínas encontradas tiveram suas quantificações relativas afetadas pela presença do bacteriófago (Figura 11-12). A flagelina está presente em quantidades relevantes apenas na presença do fago, o que pode ser uma resposta da bactéria à ação do fago sobre o biofilme ou nas moléculas de adesão, uma vez que essa proteína é componente do flagelo e está associada ao processo adesão inicial dos microrganismos às superfícies, favorecendo uma maior formação de biofilme (Zhou et al., 2014).

Não foi observado alteração na abundância relativa da camada S na cepa *O. teriensis* na presença do bacteriófago (figura 11). A camada S tem um papel crucial para o surgimento de bactérias resistentes ao ataque dos fagos, por meio do bloqueio dos receptores do fago presentes na superfície bacteriana, tornando-os inacessíveis aos domínios de ligação dos fagos (Bertozzi Silva et al., 2016). A camada S pode ter protegido as células da *O. teriensis* do ataque do bacteriófago, impedindo que ocorra o reconhecimento do receptor celular pelo fago, consequentemente não ocorre a infecção viral, isso explica o resultado encontrado na figura 6.

As concentrações das proteínas de membrana externa (Opm), receptor extracelular de ligação da espécie *D. marinus* e proteína transportadora peptídeo/níquel e proteínas envolvidas no transporte de membrana do tipo ABC da espécie *O. teriensis* não apresentaram diferenciação na abundancia relativa quando comparadas ao controle. Tais proteínas são possíveis receptores celulares e transportadores do material genético do vírus no processo de adsorção do fago (Golais, F. et al., 2013; Bertozzi Silva et al., 2016).

As proteínas sulfato adeniltransferase e sulfito redutase tiveram seus níveis de abundâncias relativos aumentados na presença do fago vB_EcoM-UFV13 (Figura 12). Essas duas proteínas fazem parte da via de redução do sulfato em *Desulfovibrio* ssp., via no qual é utilizada para obtenção de energia, a partir da reação de oxidação de compostos orgânicos ou o hidrogênio (doadores de elétrons) pelo sulfato, tendo como produto final o sulfeto de hidrogênio (Kappler e Dahl, 2001; Pereira et al., 2008). Inicialmente o sulfato é ativado à custa de duas moléculas de ATP através da atividade da sulfato adenililtransferase (equação 1), produzindo adenosina fosfossulfato (APS). A APS é reduzida pela enzima APS redutase, gerando uma molécula de sulfito e AMP (equação 2). Por último, ocorre a redução de seis elétrons de sulfito para sulfeto utilizando o hidrogênio como fonte de elétrons, através da sulfito redutase dissimilatória (equação 3), acoplada à fosforilação oxidativa (Clark et al., 2012; Keller et al., 2014).



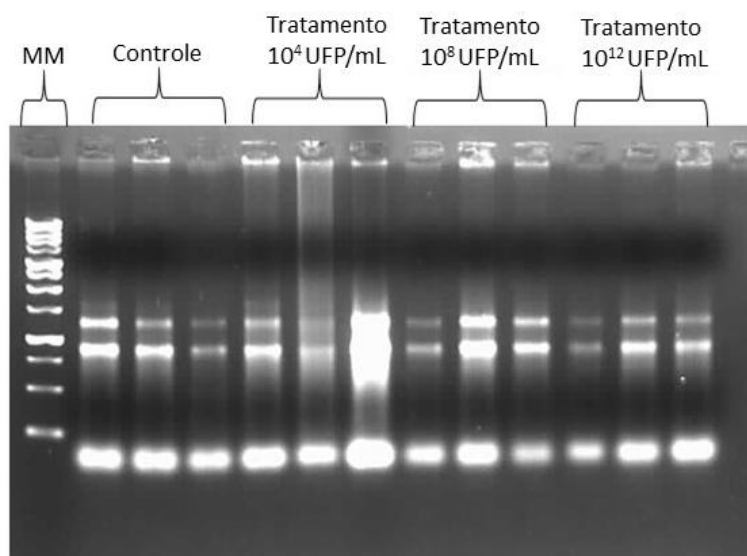
Estudo futuros são necessários para avaliar se a presença do fago ocasionou um aumento da demanda energética das células, que consequentemente promoveu um aumento na expressão de enzimas envolvidas na via de redução do sulfato, para suprir o aumento na demanda por energia.

Por último, foi observada uma diminuição na abundância relativa da chaperonina 60 kDa no biofilme na presença do fago vB_EcoM-UFV13 (figura 12). Tal proteína tem como principais funções evitar associação inapropriada entre subunidades e domínios proteicos durante o processo de dobramento, e facilitar sua (re)dobragem correta (Brinker e Hartl, 2001). No entanto, trabalhos utilizando *E. coli* que apresentam mutações no gene que codifica a chaperonina 60 kDa, se tornaram incapazes de propagar os fagos T4 e T5, mostrando que essa proteína é essencial na montagem dos bacteriófagos (Georgopoulos e Hohn, 1978; Hendrix, 1979). Essa diminuição na quantidade de proteína pode ser uma resposta adaptativa da bactéria à ação do fago, assim, mesmo que o vírus seja capaz de infectar a *D. marinus*, a ausência de chaperoninas impede a montagem de novas partículas virais e consequentemente impe a lise celular. Isso explicaria o fato do fago vB_EcoM-UFV13 não ter sido capaz de inibir o crescimento bacteriano nos tratamentos 10^4 e 10^8 UFP/mL (figura 9).

5.7. Análise de expressão gênica por q-PCR

O RNA extraído das células presentes no biofilme tratado e não tratado apresentou boa qualidade como observada através de técnica de eletroforese (figura 13).

Figura 13: Eletroforese em gel de agarose 1% das amostras de RNA total. MM: marcador de molecular 1kb (Kasvi).



Fonte: A autora.

Com o objetivo de compreender a influência do fago na expressão de alguns genes relacionados à formação do biofilme e genes envolvidos na captura, transporte e armazenamento do ferro nas células, foi realizada a q-PCR. O gene *gyrA* foi utilizado para normalizar (controle endógeno) todos os Cq's gerados dos genes analisados.

Um dos principais componentes dos biofilmes relatado são os carboidratos (Limoli et al., 2015). Eles auxiliam no processo de adesão celular, além de proteger as células contra agentes antimicrobianos. Sabendo de sua importância, foram selecionados 3 genes envolvidos na via de síntese e transporte de polissacarídeos.

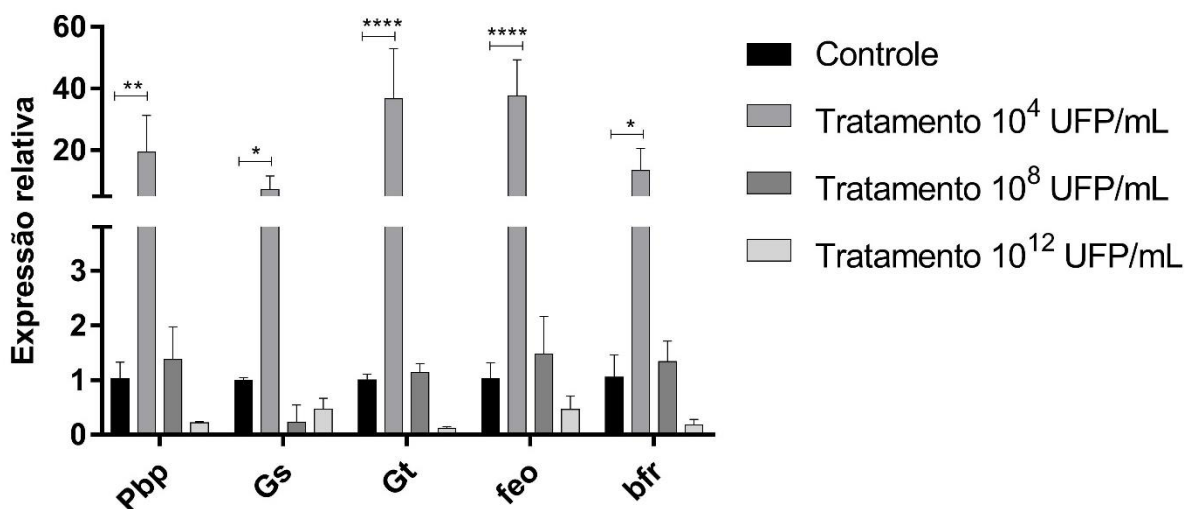
A expressão dos genes relacionados a biossíntese de carboidratos (Pbp, Gs e Gt) nas células presentes nos biofilmes submetidos a média e alta concentração de fago, não apresentaram alterações significativas em relação ao controle (figura 14). No entanto, foi observado um aumento significativo nos níveis de expressão de todos os genes avaliados nas células presentes no biofilme tratado com baixa concentração de fago (tratamento 10^4 UFP/mL) em relação ao controle. A baixa concentração de fago vB_EcoM-UFV13 foi capaz de alterar os níveis de expressão gênica dos três genes analisados. Provavelmente a baixa carga viral desencadeou uma resposta adaptativa a ação antimicrobiana do fago, alterando o padrão de expressão de genes relacionados a biossíntese de exopolissacarídeos, como já foi observado em outros trabalhos (Qurashi e Sabri, 2012; Chu et al., 2018), mecanismo utilizado pelas bactérias para bloquear o processo de adsorção do vírus, promovendo a ocultação do receptor por meio

de uma barreira física (Golais, F. et al., 2013; Shabbir, M. A. et al., 2016). Os resultados encontrados estão em acordo com o que já havia sido observado na quantificação de açúcar (figura 9), no qual houve um aumento na quantidade de carboidratos presente no biofilme no tratamento 10^4 UFP/mL.

A proteína de armazenamento de ferro, bacterioferritina (bfr), teve os transcritos aumentados dentro das células do biofilme no tratamento com baixa concentração de fago, juntamente com a proteína de transporte de ferro (*feo*). Hindre, et al. (2008) observou que a espécie *P. aeruginosa* utiliza o ferro como uma molécula sinalizadora para produzir biofilmes mais espessos com morfologia de cogumelos, como resposta adaptativa (2008).

A presença de diferentes VAPGHs encontradas no genoma do fago vB_EcoM-UFV13 indica que ele pode estar atuando diretamente sobre o envelope celular e/ou as substâncias poliméricas extracelulares de biofilme, alterando o padrão de expressão gênica, conforme demonstrado nas figuras 11-12, e 14, promovendo a degradação dos principais componentes responsáveis pela adesão e estabilidade do biofilme, conseqüentemente levando a uma diminuição do biofilme como demonstrado no MEV (Figura 8) (Da Silva Duarte, V. et al., 2018; Fernandes e Sao-Jose, 2018).

Figura 14: Avaliação da expressão transcricional dos genes: proteína de biossíntese de exopolissacarídeo (Pbp), glicogênio sintase (Gs), glicosil transferase (Gt), bacterioferritina (bfr) e proteínas de transporte de ferro (*feo*) nos biofilmes tratados. Diferenças estaticamente obtidas quando comparadas ao controle (* P < 0,05, ** P < 0,01, **** P<0,0001), (n=3).



Fonte: A autora.

6. CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que a administração do fago vB_EcoM-UFV13 em média (10^8 UFP/mL) e alta (10^{12} UFP/mL) foi capaz de prevenir a formação de biofilme desenvolvido do consórcio P48SEP, além disso, tais concentrações virais promoveram a diminuição das principais biomoléculas responsáveis pelo processo de adesão e estabilização do biofilme, também reduziu o número de células vivas aderidas ao biofilme. Este trabalho mostra pela primeira vez a capacidade de um bacteriófago não específico de prevenir a formação de biofilme proveniente de BRS, sendo uma alternativa promissora para o controle da biocorrosão em oleodutos e tanques de armazenamentos.

7. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. JACOBSON, G. **Corrosion at Prudhoe Bay - A lesson on the line.** 2007. 26-34.
- ABDELKADER, K. et al. The Preclinical and Clinical Progress of Bacteriophages and Their Lytic Enzymes: The Parts are Easier than the Whole. **Viruses**, v. 11, n. 2, Jan 24 2019. ISSN 1999-4915 (Electronic) 1999-4915 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30678377> >.
- ABEDON, S. T. et al. Bacteriophage prehistory: Is or is not Hankin, 1896, a phage reference? **Bacteriophage**, v. 1, n. 3, p. 174-178, May-Jun 2011. ISSN 2159-7073 (Print) 2159-7073.
- ACKERMANN, H. W.; PRANGISHVILI, D. Prokaryote viruses studied by electron microscopy. **Arch Virol**, v. 157, n. 10, p. 1843-9, Oct 2012. ISSN 1432-8798 (Electronic) 0304-8608 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22752841> >.
- ADRIAENSSENS, E. M. et al. Taxonomy of prokaryotic viruses: 2017 update from the ICTV Bacterial and Archaeal Viruses Subcommittee. **Arch Virol**, v. 163, n. 4, p. 1125-1129, Apr 2018. ISSN 1432-8798 (Electronic) 0304-8608 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29356990> >.
- ALABBAS, F. M. et al. Influence of sulfate reducing bacterial biofilm on corrosion behavior of low-alloy, high-strength steel (API-5L X80). **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 78, p. 34-42, 2013/03/01/ 2013. ISSN 0964-8305. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096483051200323X> >.
- ANTONIO, M. R.; KARET, G. B.; GUZOWSKI, J. P. Iron chemistry in petroleum production. **Fuel**, v. 79, n. 1, p. 37-45, 2000/01/01/ 2000. ISSN 0016-2361. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016236199001325> >.
- AYANGBENRO, A. S.; OLANREWaju, O. S.; BABALOLA, O. O. Sulfate-Reducing Bacteria as an Effective Tool for Sustainable Acid Mine Bioremediation. **Front Microbiol**, v. 9, p. 1986, 2018. ISSN 1664-302X (Print) 1664-302X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30186280> >.
- BALCAZAR, J. L.; SUBIRATS, J.; BORREGO, C. M. The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance. **Front Microbiol**, v. 6, p. 1216, 2015. ISSN 1664-302X (Print) 1664-302X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26583011> >.
- BARTON, L. L.; HAMILTON, W. A. **Sulphate-reducing bacteria: environmental and engineered systems.** Cambridge University Press, 2007. ISBN 1139463985.
- BERTOZZI SILVA, J.; STORMS, Z.; SAUVAGEAU, D. Host receptors for bacteriophage adsorption. **FEMS Microbiol Lett**, v. 363, n. 4, Feb 2016. ISSN 1574-6968 (Electronic) 0378-1097 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26755501> >.
- BHOLA, S. M. et al. Neem extract as an inhibitor for biocorrosion influenced by sulfate reducing bacteria: A preliminary investigation. **Engineering Failure Analysis**, v. 36, p. 92-103, 2014/01/01/ 2014. ISSN 1350-6307. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350630713003051> >.

BLACKWOOD, D. J. An Electrochemist Perspective of Microbiologically Influenced Corrosion. **Corrosion and Materials Degradation**, v. 1, n. 1, p. 59-76, 2018. ISSN 2624-5558. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/2624-5558/1/1/5> >.

BORN, Y. et al. Novel virulent and broad-host-range *Erwinia amylovora* bacteriophages reveal a high degree of mosaicism and a relationship to Enterobacteriaceae phages. **Appl Environ Microbiol**, v. 77, n. 17, p. 5945-54, Sep 2011. ISSN 1098-5336 (Electronic) 0099-2240 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21764969> >.

BRINKER, A.; HARTL, F. U. Chaperonins. In: BRENNER, S. e MILLER, J. H. (Ed.). **Encyclopedia of Genetics**. New York: Academic Press, 2001. p.324-325. ISBN 978-0-12-227080-2.

BRUSSOW, H.; CANCHAYA, C.; HARDT, W. D. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 68, n. 3, p. 560-602, table of contents, Sep 2004. ISSN 1092-2172 (Print) 1092-2172 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15353570> >.

BUSH, K. et al. Tackling antibiotic resistance. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 12, p. 894-6, Nov 2 2011. ISSN 1740-1534 (Electronic) 1740-1526 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22048738> >.

BUTTNER, C. et al. Bacteriophages and Bacterial Plant Diseases. **Front Microbiol**, v. 8, p. 34, 2017. ISSN 1664-302X (Print) 1664-302X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28163700> >.

CHU, E. K. et al. Self-induced mechanical stress can trigger biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli*. **Nat Commun**, v. 9, n. 1, p. 4087, Oct 5 2018. ISSN 2041-1723 (Electronic) 2041-1723 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30291231> >.

CLARK, M. E. et al. Transcriptomic and proteomic analyses of *Desulfovibrio vulgaris* biofilms: carbon and energy flow contribute to the distinct biofilm growth state. **BMC Genomics**, v. 13, p. 138, Apr 16 2012. ISSN 1471-2164 (Electronic) 1471-2164 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22507456> >.

CORDAS, C. M. et al. Electroactive biofilms of sulphate reducing bacteria. **Electrochimica Acta**, v. 54, n. 1, p. 29-34, 2008/12/01/ 2008. ISSN 0013-4686. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468608002430> >.

CRISPIM, J. S. et al. *Desulfovibrio alaskensis* prophages and their possible involvement in the horizontal transfer of genes by outer membrane vesicles. **Gene**, v. 703, p. 50-57, Jun 30 2019. ISSN 1879-0038 (Electronic) 0378-1119 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30965126> >.

D'HERELLE, F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. **CR Acad. Sci. Paris**, v. 165, p. 373-375, 1917.

DA SILVA DUARTE, V. et al. A *T4virus* prevents biofilm formation by *Trueperella pyogenes*. **Vet Microbiol**, v. 218, p. 45-51, May 2018. ISSN 1873-2542 (Electronic) 0378-1135 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29685220> >.

DALL'AGNOL, L. T.; CORDAS, C. M.; MOURA, J. J. G. Influence of respiratory substrate in carbon steel corrosion by a Sulphate Reducing Prokaryote model organism.

Bioelectrochemistry, v. 97, p. 43-51, 2014/06/01/ 2014. ISSN 1567-5394. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567539413001072> >.

DANG, H.; LOVELL, C. R. Microbial Surface Colonization and Biofilm Development in Marine Environments. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 80, n. 1, p. 91-138, Mar 2016. ISSN 1098-5557 (Electronic) 1092-2172 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26700108> >.

DEL JUNCO, A. S. et al. Microbial induced corrosion of metallic antiquities and works of art: a critical review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 29, n. 3, p. 367-375, 1992/01/01/ 1992. ISSN 0964-8305. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/096483059290053Q> >.

DHIA THABET, O. B. et al. *Desulfovibrio marinus* sp. nov., a moderately halophilic sulfate-reducing bacterium isolated from marine sediments in Tunisia. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 57, n. Pt 9, p. 2167-70, Sep 2007. ISSN 1466-5026 (Print) 1466-5026 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17766893> >.

DONG, Z. H. et al. Heterogeneous corrosion of mild steel under SRB-biofilm characterised by electrochemical mapping technique. **Corrosion Science**, v. 53, n. 9, p. 2978-2987, 2011/09/01/ 2011. ISSN 0010-938X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010938X11002630> >.

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerg Infect Dis**, v. 8, n. 9, p. 881-90, Sep 2002. ISSN 1080-6040 (Print) 1080-6040 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12194761> >.

DUARTE, V. S. et al. Complete Genome Sequence of vB_EcoM-UFV13, a New Bacteriophage Able To Disrupt *Trueperella pyogenes* Biofilm. **Genome Announc**, v. 4, n. 6, Dec 8 2016. ISSN 2169-8287 (Print). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27932642> >.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956. ISSN 0003-2700.

ELMAWGOUD, H. A. et al. Modeling of hydrogen sulfide removal from Petroleum production facilities using H₂S scavenger. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 24, n. 2, p. 131-137, 2015/06/01/ 2015. ISSN 1110-0621. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1110062115000276> >.

ENNING, D.; GARRELF, J. Corrosion of iron by sulfate-reducing bacteria: new views of an old problem. **Appl Environ Microbiol**, v. 80, n. 4, p. 1226-36, Feb 2014. ISSN 1098-5336 (Electronic) 0099-2240 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24317078> >.

FERNANDES, S.; SAO-JOSE, C. Enzymes and Mechanisms Employed by Tailed Bacteriophages to Breach the Bacterial Cell Barriers. **Viruses**, v. 10, n. 8, Jul 27 2018. ISSN 1999-4915 (Electronic) 1999-4915 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30060520> >.

FLICKINGER, M. C. **Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology, 7 Volume Set**. John Wiley & Sons, 2010. ISBN 0471799300.

FONG, J. N. C.; YILDIZ, F. H. Biofilm Matrix Proteins. **Microbiol Spectr**, v. 3, n. 2, Apr 2015. ISSN 2165-0497 (Electronic) 2165-0497 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26104709> >.

FORSYTHE, S. J. **The microbiology of safe food**. John Wiley & Sons, 2011. ISBN 1444359665.

GARRETT, T. R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, v. 18, n. 9, p. 1049-1056, 2008/09/10/ 2008. ISSN 1002-0071. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1002007108002049> >.

GEORGOPOULOS, C. P.; HOHN, B. Identification of a host protein necessary for bacteriophage morphogenesis (the groE gene product). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 75, n. 1, p. 131-5, Jan 1978. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/343101> >.

GOLAIS, F.; HOLLY, J.; VITKOVSKA, J. Coevolution of bacteria and their viruses. **Folia Microbiol (Praha)**, v. 58, n. 3, p. 177-86, May 2013. ISSN 1874-9356 (Electronic) 0015-5632 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22993102> >.

GUIAMET, P.; GÓMEZ DE SARAIVA, S. Laboratory studies of biocorrosion control using traditional and environmentally friendly biocides: an overview. **Latin American applied research**, v. 35, n. 4, p. 295-300, 2005. ISSN 0327-0793.

HAMILTON, W. A. Microbially influenced corrosion as a model system for the study of metal microbe interactions: a unifying electron transfer hypothesis. **Biofouling**, v. 19, n. 1, p. 65-76, Feb 2003. ISSN 0892-7014 (Print) 0892-7014 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14618690> >.

HARADA, L. K. et al. Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. **Microbiol Res**, v. 212-213, p. 38-58, Jul - Aug 2018. ISSN 1618-0623 (Electronic) 0944-5013 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29853167> >.

HEIDELBERG, J. F. et al. The genome sequence of the anaerobic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 554-559, 2004/05/01 2004. ISSN 1546-1696. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/nbt959> >.

HENDRIX, R. W. Purification and properties of groE, a host protein involved in bacteriophage assembly. **J Mol Biol**, v. 129, n. 3, p. 375-92, Apr 15 1979. ISSN 0022-2836 (Print) 0022-2836 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/379350> >.

HINDRE, T. et al. Transcriptional profiling of *Legionella pneumophila* biofilm cells and the influence of iron on biofilm formation. **Microbiology**, v. 154, n. Pt 1, p. 30-41, Jan 2008. ISSN 1350-0872 (Print) 1350-0872 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18174123> >.

JACHLEWSKI, S. et al. Isolation of Extracellular Polymeric Substances from Biofilms of the Thermoacidophilic Archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. **Front Bioeng Biotechnol**, v. 3, p. 123, 2015. ISSN 2296-4185 (Print) 2296-4185 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26380258> >.

JAVAHERDASHTI, R. **Microbiologically influenced corrosion: an engineering insight**. 2008: London, UK: Springer-Verlag.

JAYASINGHEARACHCHI, H. S.; LAL, B. *Oceanotoga teriensis* gen. nov., sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from offshore oil-producing wells. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 61, n. Pt 3, p. 554-60, Mar 2011. ISSN 1466-5034 (Electronic) 1466-5026 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20382783> >.

KAPPLER, U.; DAHL, C. Enzymology and molecular biology of prokaryotic sulfite oxidation. **FEMS Microbiol Lett**, v. 203, n. 1, p. 1-9, Sep 11 2001. ISSN 0378-1097 (Print) 0378-1097 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11557133> >.

KEEN, E. C.; ADHYA, S. L. Phage Therapy: Current Research and Applications. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 61, n. 1, p. 141-142, 2015. ISSN 1058-4838 1537-6591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4481600/> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC4481600/> >.

KELLER, K. L. et al. New model for electron flow for sulfate reduction in *Desulfovibrio alaskensis* G20. **Appl Environ Microbiol**, v. 80, n. 3, p. 855-68, Feb 2014. ISSN 1098-5336 (Electronic) 0099-2240 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24242254> >.

KIP, N.; VAN VEEN, J. A. The dual role of microbes in corrosion. **ISME J**, v. 9, n. 3, p. 542-51, Mar 2015. ISSN 1751-7370 (Electronic) 1751-7362 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25259571> >.

KOVAC, J.; VITEZOVA, M.; KUSHKEVYCH, I. Metabolic Activity of Sulfate-Reducing Bacteria from Rodents with Colitis. **Open Med (Wars)**, v. 13, p. 344-349, 2018. ISSN 2391-5463 (Print). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30191181> >.

LANE, D. 16S/23S rRNA sequencing. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**, p. 115-175, 1991.

LATKA, A. et al. Bacteriophage-encoded virion-associated enzymes to overcome the carbohydrate barriers during the infection process. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 101, n. 8, p. 3103-3119, Apr 2017. ISSN 1432-0614 (Electronic) 0175-7598 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28337580> >.

LIMOLI, D. H.; JONES, C. J.; WOZNIAK, D. J. Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. **Microbiol Spectr**, v. 3, n. 3, Jun 2015. ISSN 2165-0497 (Electronic) 2165-0497 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26185074> >.

LITTLE, B.; LEE, J.; RAY, R. A review of 'green' strategies to prevent or mitigate microbiologically influenced corrosion. **Biofouling**, v. 23, n. 1-2, p. 87-97, 2007. ISSN 0892-7014 (Print) 0892-7014 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17453733> >.

LITTLE, B.; WAGNER, P.; MANSFELD, F. Microbiologically influenced corrosion of metals and alloys. **International Materials Reviews**, v. 36, n. 1, p. 253-272, 1991/01/01 1991. ISSN 0950-6608. Disponível em: < <https://doi.org/10.1179/imr.1991.36.1.253> >.

LITTLE, B. J.; LEE, J. S. **Microbiologically influenced corrosion**. John Wiley & Sons, 2007. ISBN 0470112441.

LU, T. K.; COLLINS, J. J. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 27, p. 11197-202, Jul 3 2007. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17592147> >.

LV, L. et al. Surface Modification of Mild Steel with Thermally Cured Antibacterial Poly(vinylbenzyl chloride)–Polyaniline Bilayers for Effective Protection against Sulfate Reducing Bacteria Induced Corrosion. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 53, n. 31, p. 12363-12378, 2014/08/06 2014. ISSN 0888-5885. Disponível em: < <https://doi.org/10.1021/ie501654b> >.

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? **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 102, n. 6, p. 2563-2581, Mar 2018. ISSN 1432-0614 (Electronic) 0175-7598 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29442169> >.

MADIGAN, M. T. et al. Brock biology of microorganisms 12th edn. **Int. Microbiol**, v. 11, p. 65-73, 2008.

MAHMOUD, M. et al. **Removal of Pyrite and Different Types of Iron Sulfide Scales in Oil and Gas Wells without H₂S Generation**. 2015.

MAIA, M. R. et al. Simple and Versatile Turbidimetric Monitoring of Bacterial Growth in Liquid Cultures Using a Customized 3D Printed Culture Tube Holder and a Miniaturized Spectrophotometer: Application to Facultative and Strictly Anaerobic Bacteria. **Front Microbiol**, v. 7, p. 1381, 2016. ISSN 1664-302X (Print) 1664-302X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27630632> >.

MUSZANSKA, A. K. et al. Bacterial adhesion forces with substratum surfaces and the susceptibility of biofilms to antibiotics. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 9, p. 4961-4, Sep 2012. ISSN 1098-6596 (Electronic) 0066-4804 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22733073> >.

MUYZER, G.; STAMS, A. J. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, n. 6, p. 441-54, Jun 2008. ISSN 1740-1534 (Electronic) 1740-1526 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18461075> >.

NEMATI, M.; JENNEMAN, G. E.; VOORDOUW, G. Mechanistic study of microbial control of hydrogen sulfide production in oil reservoirs. **Biotechnol Bioeng**, v. 74, n. 5, p. 424-34, Sep 5 2001. ISSN 0006-3592 (Print) 0006-3592 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11427944> >.

PARK, G. T. et al. Effect of microstructure on the hydrogen trapping efficiency and hydrogen induced cracking of linepipe steel. **Corrosion Science**, v. 50, n. 7, p. 1865-1871, 2008/07/01/2008. ISSN 0010-938X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010938X08001558> >.

PEI, R.; LAMAS-SAMANAMUD, G. R. Inhibition of biofilm formation by T7 bacteriophages producing quorum-quenching enzymes. **Appl Environ Microbiol**, v. 80, n. 17, p. 5340-8, Sep 2014. ISSN 1098-5336 (Electronic) 0099-2240 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24951790> >.

PEREIRA, P. M. et al. Energy metabolism in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough: insights from transcriptome analysis. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 93, n. 4, p. 347-62, May 2008.

ISSN 0003-6072 (Print) 0003-6072 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18060515> >.

PETROVA, O. E.; SAUER, K. Sticky situations: key components that control bacterial surface attachment. **J Bacteriol**, v. 194, n. 10, p. 2413-25, May 2012. ISSN 1098-5530 (Electronic)0021-9193 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22389478> >.

PIRES, D. P. et al. Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 100, n. 5, p. 2141-51, Mar 2016. ISSN 1432-0614 (Electronic) 0175-7598 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26767986> >.

POSPIECH, A.; NEUMANN, B. A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. **Trends Genet**, v. 11, n. 6, p. 217-8, Jun 1995. ISSN 0168-9525 (Print) 0168-9525 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7638902> >.

POSTGATE, J. R. **The sulphate-reducing bacteria**. CUP Archive, 1979. ISBN 0521221889.

QURASHI, A. W.; SABRI, A. N. Bacterial exopolysaccharide and biofilm formation stimulate chickpea growth and soil aggregation under salt stress. **Braz J Microbiol**, v. 43, n. 3, p. 1183-91, Jul 2012. ISSN 1517-8382 (Print) 1517-8382 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24031943> >.

REZA, J. **Microbiologically influenced corrosion an engineering insight**: Springer-Verlag London Limited 2008.

ROSA, J. P. et al. *Streptomyces lunalinharesii* 235 prevents the formation of a sulfate reducing bacterial biofilm. **Braz J Microbiol**, v. 47, n. 3, p. 603-9, Jul-Sep 2016. ISSN 1678-4405 (Electronic) 1517-8382 (Linking). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27266627> >.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold spring harbor laboratory press, 1989. ISBN 0879693096.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.; RUSSELL, D. Molecular cloning, a laboratory manual (3-volume set) Cold spring harbor laboratory press Cold Spring Harbor, New York (2001). Sterer, N., Hendler, A., Davidi, MP & Rosenberg, M. A novel microscopic assay for oral malodour-related microorganisms. **J Breath Res**, v. 2, p. 026003, 2008.

SHABBIR, M. A. B. et al. Bacteria vs. Bacteriophages: Parallel Evolution of Immune Arsenals. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1292, 2016-August-17 2016. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.01292> >.

SHARMA, M. et al. Effect of selected biocides on microbiologically influenced corrosion caused by *Desulfovibrio ferrophilus* IS5. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 16620, Nov 9 2018. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30413730> >.

SOUZA, P. M. et al. Growth Inhibition of Sulfate-Reducing Bacteria in Produced Water from the Petroleum Industry Using Essential Oils. **Molecules**, v. 22, n. 4, Apr 19 2017. ISSN 1420-3049 (Electronic) 1420-3049 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28422054> >.

SUTHERLAND, I. W. et al. The interaction of phage and biofilms. **FEMS Microbiol Lett**, v. 232, n. 1, p. 1-6, Mar 12 2004. ISSN 0378-1097 (Print) 0378-1097 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15061140> >.

TAMURA, K. et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol Biol Evol**, v. 24, n. 8, p. 1596-9, Aug 2007. ISSN 0737-4038 (Print) 0737-4038 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17488738> >.

TANG, K.; BASKARAN, V.; NEMATI, M. Bacteria of the sulphur cycle: An overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 73-94, 2009/04/15/ 2009. ISSN 1369-703X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X08004087> >.

THOMPSON, J. D. et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res**, v. 25, n. 24, p. 4876-82, Dec 15 1997. ISSN 0305-1048 (Print) 0305-1048 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9396791> >.

TOYOFUKU, M. et al. Environmental factors that shape biofilm formation. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 80, n. 1, p. 7-12, 2016. ISSN 1347-6947 (Electronic) 0916-8451 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26103134> >.

TWORT, F. W. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. **The Lancet**, v. 186, n. 4814, p. 1241-1243, 1915. ISSN 0140-6736.

VIDELA, H. A.; HERRERA, L. K. Microbiologically influenced corrosion: looking to the future. **Int Microbiol**, v. 8, n. 3, p. 169-80, Sep 2005. ISSN 1139-6709 (Print) 1139-6709 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16200495> >.

VOORDOUW, G. Carbon monoxide cycling by *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. **J Bacteriol**, v. 184, n. 21, p. 5903-11, Nov 2002. ISSN 0021-9193 (Print) 0021-9193 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12374824> >.

WANG, R. et al. Inhibition of *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* adhesion and biofilm formation on medical grade silicone surface. **Biotechnol Bioeng**, v. 109, n. 2, p. 336-45, Feb 2012. ISSN 1097-0290 (Electronic) 0006-3592 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21956834> >.

WARSCHEID, T.; BRAAMS, J. Biodeterioration of stone: a review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 46, n. 4, p. 343-368, 2000/12/01/ 2000. ISSN 0964-8305. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830500001098> >.

WEINBAUER, M. G. Ecology of prokaryotic viruses. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, n. 2, p. 127-181, 2004. ISSN 0168-6445. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.08.001> >. Acesso em: 7/18/2019.

WHITCHURCH, C. B. et al. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. **Science**, v. 295, n. 5559, p. 1487, Feb 22 2002. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11859186> >.

WOMMACK, K. E.; COLWELL, R. R. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 64, n. 1, p. 69-114, Mar 2000. ISSN 1092-2172 (Print) 1092-2172 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10704475> >.

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. 52-8, Aug 2016. ISSN 1878-562X (Electronic) 1567-5394 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27071053> >.

XU, D. et al. Laboratory investigation of microbiologically influenced corrosion of C1018 carbon steel by nitrate reducing bacterium *Bacillus licheniformis*. **Corrosion Science**, v. 77, p. 385-390, 2013/12/01/ 2013. ISSN 0010-938X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010938X13003545> >.

YAN, J.; MAO, J.; XIE, J. Bacteriophage polysaccharide depolymerases and biomedical applications. **BioDrugs**, v. 28, n. 3, p. 265-74, Jun 2014. ISSN 1179-190X (Electronic) 1173-8804 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24352884> >.

YUAN, S. J.; PEHKONEN, S. O. AFM study of microbial colonization and its deleterious effect on 304 stainless steel by *Pseudomonas* NCIMB 2021 and *Desulfovibrio desulfuricans* in simulated seawater. **Corrosion Science**, v. 51, n. 6, p. 1372-1385, 2009/06/01/ 2009. ISSN 0010-938X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010938X09001413> >.

ZHAO, K. et al. Psl trails guide exploration and microcolony formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Nature**, v. 497, n. 7449, p. 388-391, May 16 2013. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23657259> >.

ZHOU, M. et al. Flagellin and F4 fimbriae have opposite effects on biofilm formation and quorum sensing in F4ac+ enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Vet Microbiol**, v. 168, n. 1, p. 148-53, Jan 10 2014. ISSN 1873-2542 (Electronic) 0378-1135 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24238669> >.

ZOU, C. et al. Energy revolution: From a fossil energy era to a new energy era. **Natural Gas Industry B**, v. 3, n. 1, p. 1-11, 2016/01/01/ 2016. ISSN 2352-8540. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352854016300109> >.

8. INFORMAÇÕES SUPLEMENTARES



Figura suplementar S1: Sistema utilizado para a análise da morfologia do biofilme formado pelo consórcio bacteriano P48SEP. Fonte: a autora.



Figura suplementar S2: Sistema utilizado para a análise da composição química, viabilidade celular, proteômica e expressão genica no biofilme formado pelo consórcio bacteriano P48SEP. Fonte: a autora.

Tabela suplementar 2: Proteínas identificadas pelo sequenciamento.

Número de acesso	Descrição
A0A1T4XJB2	ATP synthase subunit alpha OS= <i>Desulfovibrio gracilis</i> DSM 16080 OX=1121449 GN=atpA PE=3 SV=1
A0A316D037	Pyruvate, phosphate dikinase OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=C7380_10361 PE=3 SV=1
A0A1M7RZA6	Dissimilatory adenylylsulfate reductase alpha subunit OS= <i>Desulfovibrio litoralis</i> DSM 11393 OX=1121455 GN=SAMN02745728_00366 PE=4 SV=1
T2GEG0	Putative amino acid-binding ACT protein OS= <i>Desulfovibrio gigas</i> (strain ATCC 19364 / DSM 1382 / NCIMB 9332 / VKM B-1759) OX=1121448 GN=DGI_2787 PE=4 SV=1
A0A1K1LEH8	Adenylate kinase OS= <i>Desulfovibrio piger</i> OX=901 GN=adk PE=3 SV=1
T2G8J0	2-amino-3,7-dideoxy-D-threo-hept-6-ulosonate synthase OS= <i>Desulfovibrio gigas</i> (strain ATCC 19364 / DSM 1382 / NCIMB 9332 / VKM B-1759) OX=1121448 GN=fbaB PE=3 SV=1
S7UYN9	Hydroxylamine reductase OS= <i>Desulfovibrio sp.</i> X2 OX=941449 GN=hcp PE=3 SV=1
A0A0H3A472	30S ribosomal protein S1 OS= <i>Desulfovibrio vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i> (strain DP4) OX=391774 GN=Dvul_0235 PE=3 SV=1
A0A353D901	10 kDa chaperonin OS= <i>Desulfovibrio sp.</i> OX=885 GN=groS PE=3 SV=1
Q315S8	Integration host factor subunit alpha OS= <i>Desulfovibrio alaskensis</i> (strain G20) OX=207559 GN=Dde_0517 PE=3 SV=1
F3YTX5	50S ribosomal protein L7/L12 OS= <i>Desulfovibrio africanus</i> str. Walvis Bay OX=690850 GN=rpL PE=3 SV=1
E1JSE4	Aldehyde dehydrogenase (NAD(+)) OS= <i>Desulfovibrio fructosivorans</i> JJ OX=596151 GN=DesfrDRAFT_0543 PE=3 SV=1
A0A212KXV5	Bacterioferritin OS=uncultured <i>Desulfovibrio sp.</i> OX=167968 GN=bfr PE=3 SV=1
E1K0P2	(P)ppGpp synthetase I, SpoT/RelA OS= <i>Desulfovibrio fructosivorans</i> JJ OX=596151 GN=DesfrDRAFT_3442 PE=3 SV=1
A0A0B1U0N7	Branched-chain amino acid ABC transporter, amino acid-binding protein OS= <i>Desulfovibrio sp.</i> TomC OX=1562888 GN=NY78_1258 PE=4 SV=1
A0A0B1U471	NAD(P)H dehydrogenase (quinone) OS= <i>Desulfovibrio sp.</i> TomC OX=1562888 GN=NY78_1477 PE=3 SV=1
A0A316CC56	DNA-binding protein HU-beta OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=C7380_13016 PE=3 SV=1
G7QCT9	Pseudouridine synthase OS= <i>Desulfovibrio sp.</i> FW1012B OX=644968 GN=DFW101_0228 PE=3 SV=1
T2G7Q3	Dissimilatory Sulfite Reductase I, chain A OS= <i>Desulfovibrio gigas</i> (strain ATCC 19364 / DSM 1382 / NCIMB 9332 / VKM B-1759) OX=1121448 GN=dsrA PE=4 SV=1

A0A388SND8	Ubiquinone/menaquinone biosynthesis C-methyltransferase UbiE OS= <i>Desulfovibrio sp.</i> HK-II OX=2009266 GN=ubiE PE=3 SV=1
B6WV15	Adenosylhomocysteinase OS= <i>Desulfovibrio piger</i> ATCC 29098 OX=411464 GN=ahcY PE=3 SV=1
T2GF45	Peroxiredoxin OS= <i>Desulfovibrio gigas</i> (strain ATCC 19364 / DSM 1382 / NCIMB 9332 / VKM B-1759) OX=1121448 GN=prxU PE=3 SV=1
T2GB98	Putative GTP-binding protein TypA OS= <i>Desulfovibrio gigas</i> (strain ATCC 19364 / DSM 1382 / NCIMB 9332 / VKM B-1759) OX=1121448 GN=DGI_2100 PE=4 SV=1
A0A212J359	Lon protease OS=uncultured <i>Desulfovibrio sp.</i> OX=167968 GN=lon PE=2 SV=1
F0JJ92	Aldehyde Dehydrogenase OS= <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ND132 OX=641491 GN=DND132_2788 PE=3 SV=1
E6VT74	50S ribosomal protein L17 OS= <i>Pseudodesulfovibrio aespoensis</i> (strain ATCC 700646 / DSM 10631 / Aspo-2) OX=643562 GN=rplQ PE=3 SV=1
A0A1G9JF27	Translation initiation factor IF-2 OS= <i>Desulfovibrio ferrireducens</i> OX=246191 GN=infB PE=3 SV=1
A0A2Z6AYU3	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase OS= <i>Desulfovibrio ferrophilus</i> OX=241368 GN=guaB PE=3 SV=1
Q1MRR0	Signal transduction histidine kinase involved in nitrogen fixation and metabolism regulation OS= <i>Lawsonia intracellularis</i> (strain PHE/MN1-00) OX=363253 GN=ntrY PE=4 SV=1
A0A316D053	Acyl carrier protein OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=acpP PE=3 SV=1
A0A1T4W2Z9	Glycine--tRNA ligase beta subunit OS= <i>Desulfovibrio bizertensis</i> DSM 18034 OX=1121442 GN=glyS PE=3 SV=1
S7VB08	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS= <i>Desulfovibrio sp.</i> X2 OX=941449 GN=dsx2_2073 PE=3 SV=1
K6HCU3	Benzoyl-CoA reductase/2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase subunit, BcrC/BadD/HgdB OS= <i>Desulfovibrio magneticus</i> str. Maddingley MBC34 OX=1206767 GN=B193_0976 PE=4 SV=1
S7VFX8	Integral membrane sensor hybrid histidine kinase OS= <i>Desulfovibrio sp.</i> X2 OX=941449 GN=dsx2_2427 PE=4 SV=1
F0JIU6	Sulfate adenylyltransferase OS= <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ND132 OX=641491 GN=DND132_2642 PE=4 SV=1
A0A388SMU7	ATP synthase subunit beta OS= <i>Desulfovibrio sp.</i> HK-II OX=2009266 GN=atpD PE=3 SV=1
A0A1B7XL73	Adenylylsulfate reductase OS= <i>Halodesulfovibrio spirochaetisodalis</i> OX=1560234 GN=SP90_02775 PE=4 SV=1
A0A212L8F0	Sulfate adenylyltransferase OS=uncultured <i>Desulfovibrio sp.</i> OX=167968 GN=sat PE=4 SV=1
A0A316MKQ0	Hydrogenase 2 large subunit OS= <i>Desulfovibrionaceae bacterium</i> OX=2049043 GN=DBY37_10995 PE=3 SV=1
A0A1T4W363	Purine-binding chemotaxis protein CheW OS= <i>Desulfovibrio bizertensis</i> DSM 18034 OX=1121442 GN=SAMN02745702_01533 PE=4 SV=1
A0A316MN81	50S ribosomal protein L16 OS= <i>Desulfovibrionaceae bacterium</i> OX=2049043 GN=rplP PE=3 SV=1

A0A349HFA3	Manganese-dependent inorganic pyrophosphatase OS= <i>Desulfovibrio sp.</i> OX=885 GN=DCS48_01465 PE=4 SV=1
A0A316CBC7	Ribosome hibernation promoting factor OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=hpf PE=3 SV=1
A0A1J5MXA6	Chaperone protein ClpB OS= <i>Pseudodesulfovibrio hydrargyri</i> OX=2125990 GN=clpB PE=3 SV=1
A0A316N7T8	ATP synthase subunit alpha OS= <i>Desulfovibrionaceae bacterium</i> OX=2049043 GN=atpA PE=3 SV=1
A0A2E3R942	Sulfurtransferase OS= <i>Desulfovibrio sp.</i> OX=885 GN=CL942_11880 PE=4 SV=1
S7T3A2	Amino acid-binding ACT domain-containing protein OS= <i>Desulfovibrio alkalitolerans</i> DSM 16529 OX=1121439 GN=dsat_0891 PE=4 SV=1
A0A120KM63	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase OS= <i>Desulfovibrio fairfieldensis</i> OX=44742 GN=guaB PE=3 SV=1
E1K208	Malate synthase G OS= <i>Desulfovibrio fructosivorans</i> JJ OX=596151 GN=glcB PE=3 SV=1
A0A1M6D5M1	Thioredoxin OS= <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> OX=876 GN=SAMN05660830_00661 PE=3 SV=1
A1VFB2	Ribosome-recycling factor OS= <i>Desulfovibrio vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i> (strain DP4) OX=391774 GN=fr PE=3 SV=1
T2GEB7	Putative Coenzyme F390 synthetase OS= <i>Desulfovibrio gigas</i> (strain ATCC 19364 / DSM 1382 / NCIMB 9332 / VKM B-1759) OX=1121448 GN=DGI_2876 PE=4 SV=1
P12944	Periplasmic [NiFe] hydrogenase large subunit OS= <i>Desulfovibrio gigas</i> OX=879 GN=hydB PE=1 SV=3
T2G7V8	Putative sulfate adenylyltransferase OS= <i>Desulfovibrio gigas</i> (strain ATCC 19364 / DSM 1382 / NCIMB 9332 / VKM B-1759) OX=1121448 GN=sat PE=4 SV=1
Q1MRB9	ATP synthase subunit alpha OS= <i>Lawsonia intracellularis</i> (strain PHE/MN1-00) OX=363253 GN=atpA PE=3 SV=1
A0A1J5MUD4	ATP synthase subunit beta OS= <i>Pseudodesulfovibrio hydrargyri</i> OX=2125990 GN=atpD PE=3 SV=1
A0A1Q8QNB0	Branched-chain amino acid ABC transporter, amino acid-binding protein OS= <i>Desulfovibrio sp.</i> DV OX=1844708 GN=DVDV_1487 PE=4 SV=1
S7T1R2	Hydroxylamine reductase OS= <i>Desulfovibrio alkalitolerans</i> DSM 16529 OX=1121439 GN=hcp PE=3 SV=1
A0A239BJU5	Enolase OS= <i>Desulfovibrio mexicanus</i> OX=147047 GN=eno PE=3 SV=1
A0A2C8F7G4	ATP synthase subunit alpha OS= <i>Pseudodesulfovibrio profundus</i> OX=57320 GN=atpA PE=3 SV=1
T2GBZ6	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 2 OS= <i>Desulfovibrio gigas</i> (strain ATCC 19364 / DSM 1382 / NCIMB 9332 / VKM B-1759) OX=1121448 GN=DGI_1913 PE=3 SV=1
A0A388SGF2	Hydroxylamine reductase OS= <i>Desulfovibrio sp.</i> HK-II OX=2009266 GN=hcp PE=3 SV=1
A0A316CZB1	Glycine cleavage system H protein OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=gcvH PE=3 SV=1
A0A316D0S4	Enolase OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=eno PE=3 SV=1

A0A357AW06	Acetyl-coenzyme A synthetase OS= <i>Desulfovibrio</i> sp. OX=885 GN=acs PE=3 SV=1
A0A316CK31	Fructose-bisphosphate aldolase class II OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=C7380_1181 PE=3 SV=1
A0A396C6D9	50S ribosomal protein L23 OS= <i>Desulfovibrio</i> sp. AM18-2 OX=2292040 GN=rplW PE=3 SV=1
E1J VX0	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha OS= <i>Desulfovibrio fructosivorans</i> JJ OX=596151 GN=rpoA PE=3 SV=1
E5Y8N0	S-adenosylmethionine synthase OS= <i>Bilophila wadsworthia</i> 3_1_6 OX=563192 GN=metK PE=3 SV=1
T2G6U8	Porphobilinogen deaminase OS= <i>Desulfovibrio gigas</i> (strain ATCC 19364 / DSM 1382 / NCIMB 9332 / VKM B-1759) OX=1121448 GN=hemC PE=3 SV=1
T2GBM4	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase OS= <i>Desulfovibrio gigas</i> (strain ATCC 19364 / DSM 1382 / NCIMB 9332 / VKM B-1759) OX=1121448 GN=ribH PE=3 SV=1
G7QBM5	Protein-glutamate methyltransferase OS= <i>Desulfovibrio</i> sp. FW1012B OX=644968 GN=DFW101_2886 PE=4 SV=1
A0A2Z6AUH8	Beta-lactamase domain protein OS= <i>Desulfovibrio ferrophilus</i> OX=241368 GN=DFE_0157 PE=4 SV=1
A0A1G9ID72	Membrane fusion protein (MFP) family protein OS= <i>Desulfovibrio ferrireducens</i> OX=246191 GN=SAMN05660337_2542 PE=3 SV=1
A0A238Y0K5	Translation initiation factor IF-2 OS= <i>Desulfovibrio mexicanus</i> OX=147047 GN=infB PE=3 SV=1
A0A316D0Y8	Nucleoside-binding protein OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=C7380_102160 PE=4 SV=1
A0A316CMX1	Maltose/maltodextrin transport system substrate-binding protein OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=C7380_1117 PE=4 SV=1
A0A316CRZ6	Ornithine carbamoyltransferase OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=C7380_10961 PE=3 SV=1
C4XL87	Hydroxylamine reductase OS= <i>Desulfovibrio magneticus</i> (strain ATCC 700980 / DSM 13731 / RS-1) OX=573370 GN=hcp PE=3 SV=1
A0A316CMQ8	L-aspartate aminotransferase /phosphoserine aminotransferase OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=C7380_11133 PE=3 SV=1
A0A316CB44	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=C7380_12724 PE=3 SV=1
A0A316CUX6	Alcohol dehydrogenase class IV OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=C7380_10814 PE=4 SV=1
A0A1N6EY21	DNA helicase OS= <i>Halodesulfovibrio marinisediminis</i> DSM 17456 OX=1121457 GN=SAMN02745161_0976 PE=4 SV=1
A0A388SJY6	Nucleoside ABC transporter OS= <i>Desulfovibrio</i> sp. HK-II OX=2009266 GN=RVX_1607 PE=4 SV=1
A0A388SMN2	Adenylylsulfate reductase alpha-subunit OS= <i>Desulfovibrio</i> sp. HK-II OX=2009266 GN=RVX_1738 PE=4 SV=1
A0A1Q8QHF7	Rhodanese-like domain protein OS= <i>Desulfovibrio</i> sp. DV OX=1844708 GN=DVDV_2489 PE=4 SV=1
A0A2C8FET9	Related to ICFG protein OS= <i>Pseudodesulfovibrio profundus</i> OX=57320 GN=DPRO_3502 PE=4 SV=1

S7U5W1	10 kDa chaperonin OS= <i>Desulfovibrio sp.</i> X2 OX=941449 GN=groS PE=3 SV=1
A0A1G9FJR0	AsmA protein OS= <i>Desulfovibrio ferrireducens</i> OX=246191 GN=SAMN05660337_1572 PE=4 SV=1
E6VTQ0	Chaperone protein ClpB OS= <i>Pseudodesulfovibrio aespoensis</i> (strain ATCC 700646 / DSM 10631 / Aspo-2) OX=643562 GN=clpB PE=3 SV=1
A0A239B4F4	Methyl-accepting chemotaxis sensory transducer with Cache sensor OS= <i>Desulfovibrio mexicanus</i> OX=147047 GN=SAMN04488503_2423 PE=4 SV=1
Q8VRV7	Adenosine-5'-phosphosulfate reductase alpha subunit (Fragment) OS= <i>Desulfovibrio giganteus</i> OX=181662 GN=apsA PE=4 SV=1
F7YV83	ATP synthase subunit alpha OS= <i>Pseudothermotoga thermarum</i> DSM 5069 OX=688269 GN=atpA PE=3 SV=1
Q9L3R0	Adenylyl-sulphate reductase alfa-subunit (Fragment) OS= <i>Desulfovibrio indonesiensis</i> OX=54767 GN=apsA PE=4 SV=1
E5Y7C2	DNA-directed RNA polymerase subunit beta OS= <i>Bilophila wadsworthia</i> 3_1_6 OX=563192 GN=rpoB PE=3 SV=1
A0A316CZK4	PTS system N-acetylglucosamine-specific IIB component (Glc family) OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=C7380_10460 PE=4 SV=1
I2Q515	Chaperone protein ClpB OS= <i>Desulfovibrio sp.</i> U5L OX=596152 GN=clpB PE=3 SV=1
S7TCV5	Coenzyme A biosynthesis bifunctional protein CoaBC OS= <i>Desulfovibrio alkalitolerans</i> DSM 16529 OX=1121439 GN=dsat_2773 PE=3 SV=1
A0A1Y4D798	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha OS= <i>Desulfovibrio sp.</i> An276 OX=1965618 GN=rpoA PE=3 SV=1
A0A0E0SZK5	Adenosylhomocysteinase OS= <i>Desulfovibrio vulgaris</i> (strain RCH1) OX=573059 GN=ahcY PE=3 SV=1
L0RI07	50S ribosomal protein L17 OS= <i>Desulfovibrio hydrothermalis</i> AM13 = DSM 14728 OX=1121451 GN=rplQ PE=3 SV=1
A0A1Y4D6U8	RNA polymerase sigma factor RpoD OS= <i>Desulfovibrio sp.</i> An276 OX=1965618 GN=rpoD PE=3 SV=1
A0A3D4GKJ9	Hydroxylamine reductase OS= <i>Desulfovibrio sp.</i> OX=885 GN=hcp PE=3 SV=1
A0A231P117	Molecular chaperone DnaJ OS= <i>Desulfovibrio sp.</i> MES5 OX=1899016 GN=BCS36_03810 PE=4 SV=1
A0A1B7XDP9	DRTGG domain protein OS= <i>Halodesulfovibrio spirochaetisodalis</i> OX=1560234 GN=SP90_08290 PE=4 SV=1
A0A316CQR3	Elongation factor Tu OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=tuf PE=3 SV=1
A0A1J1DQL4	Inorganic pyrophosphatase OS= <i>Candidatus Desulfovibrio trichonymphae</i> OX=1725232 GN=ppaC PE=4 SV=1
Q313Y3	Efflux transporter, RND family, MFP subunit OS= <i>Desulfovibrio alaskensis</i> (strain G20) OX=207559 GN=Dde_0962 PE=3 SV=1
A0A3D4GL44	Cell division protein FtsA (Fragment) OS= <i>Desulfovibrio sp.</i> OX=885 GN=ftsA PE=3 SV=1

A0A126QK34	Branched chain amino acid ABC transporter substrate-binding protein OS= <i>Pseudodesulfovibrio indicus</i> OX=1716143 GN=AWY79_04245 PE=4 SV=1
A0A1T4XZL8	Iron-sulfur cluster-binding protein OS= <i>Desulfovibrio gracilis</i> DSM 16080 OX=1121449 GN=SAMN02745704_02627 PE=4 SV=1
T2GBU4	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase OS= <i>Desulfovibrio gigas</i> (strain ATCC 19364 / DSM 1382 / NCIMB 9332 / VKM B-1759) OX=1121448 GN=pnp PE=3 SV=1
A0A231P4E7	Acyl transferase OS= <i>Desulfovibrio sp.</i> MES5 OX=1899016 GN=BCS36_07720 PE=4 SV=1
A0A3C0RVG2	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase OS= <i>Desulfovibrio sp.</i> OX=885 GN=aroA PE=3 SV=1
A0A316D2D6	5'-nucleotidase/UDP-sugar diphosphatase OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=C7380_103136 PE=3 SV=1
A0A316CZ12	M18 family aminopeptidase OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=C7380_10632 PE=3 SV=1
A0A1M6GPG1	Dissimilatory adenylylsulfate reductase alpha subunit OS= <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> OX=876 GN=SAMN05660830_01695 PE=4 SV=1
A0A316CC71	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=pnp PE=3 SV=1
A0A316CKB9	Rubryerythrin OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=C7380_11431 PE=4 SV=1
A0A1K1LGW4	Pyruvate synthase OS= <i>Desulfovibrio piger</i> OX=901 GN=DESPIGER_2114 PE=4 SV=1
C6BUG8	Nickel-dependent hydrogenase large subunit OS= <i>Desulfovibrio salexigens</i> (strain ATCC 14822 / DSM 2638 / NCIB 8403 / VKM B-1763) OX=526222 GN=Desal_1916 PE=3 SV=1
M1WRK9	Acetyl-coenzyme A synthetase OS= <i>Pseudodesulfovibrio piezophilus</i> (strain DSM 21447 / JCM 15486 / C1TLV30) OX=1322246 GN=acsA PE=3 SV=1
A0A1E7I6Q6	Elongation factor Tu OS= <i>Desulfovibrio sp.</i> S3730MH75 OX=1869297 GN=tuf PE=3 SV=1
A0A316D9Y0	Pyruvate ferredoxin oxidoreductase alpha subunit OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=C7380_11114 PE=4 SV=1
A0A316CZY5	Elongation factor P OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=efp PE=3 SV=1
A0A316C6U8	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=C7380_1344 PE=4 SV=1
A0A353DBV2	Sigma-54-dependent Fis family transcriptional regulator OS= <i>Desulfovibrio sp.</i> OX=885 GN=DDW80_08630 PE=4 SV=1
A0A316CGD9	Purine nucleoside phosphorylase OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=C7380_11753 PE=3 SV=1
A0A0B1TYC4	Elongation factor Tu OS= <i>Desulfovibrio sp.</i> TomC OX=1562888 GN=tuf PE=3 SV=1
C4XS67	GTP-binding protein TypA/BipA OS= <i>Desulfovibrio magneticus</i> (strain ATCC 700980 / DSM 13731 / RS-1) OX=573370 GN=typA PE=4 SV=1

A0A1B7XGB3	2-amino-3,7-dideoxy-D-threo-hept-6-ulosonate synthase OS= <i>Halodesulfovibrio spirochaetisodalis</i> OX=1560234 GN=aroA' PE=3 SV=1
A0A1G7R626	ATP synthase subunit alpha OS= <i>Desulfovibrio legallii</i> OX=571438 GN=atpA PE=3 SV=1
T2GBN8	Putative Pyruvate water dikinase, phosphoenolpyruvate--protein phosphotransferase OS= <i>Desulfovibrio gigas</i> (strain ATCC 19364 / DSM 1382 / NCIMB 9332 / VKM B-1759) OX=1121448 GN=ppdK PE=4 SV=1
A0A2V2GFD3	Serine hydroxymethyltransferase OS= <i>Desulfovibrionaceae bacterium</i> OX=2049043 GN=glyA PE=3 SV=1
A0A316D839	50S ribosomal protein L10 OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=rplJ PE=3 SV=1
C6BSP4	Bifunctional protein GlmU OS= <i>Desulfovibrio salexigens</i> (strain ATCC 14822 / DSM 2638 / NCIB 8403 / VKM B-1763) OX=526222 GN=glmU PE=3 SV=1
A0A316CBV4	Multifunctional fusion protein OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=tpiA PE=3 SV=1
M1WMV4	Transglutaminase family protein cysteine peptidase BTLCP (Modular protein) OS= <i>Pseudodesulfovibrio piezophilus</i> (strain DSM 21447 / JCM 15486 / C1TLV30) OX=1322246 GN=BN4_12757 PE=4 SV=1
F3Z244	Phosphoenolpyruvate synthase OS= <i>Desulfovibrio africanus</i> str. Walvis Bay OX=690850 GN=Desaf_2946 PE=3 SV=1
A0A316ME34	Translation initiation factor IF-2 OS= <i>Desulfovibrionaceae bacterium</i> OX=2049043 GN=infB PE=3 SV=1
A0A212JFX5	Vitamin B12-dependent ribonucleotide reductase OS=uncultured <i>Desulfovibrio</i> sp. OX=167968 GN=KM92DES2_11043 PE=3 SV=1
A0A1G9FR64	Tripartite ATP-independent transporter solute receptor, DctP family OS= <i>Desulfovibrio ferrireducens</i> OX=246191 GN=SAMN05660337_1666 PE=4 SV=1
A0A3C0RUE2	Protein TonB OS= <i>Desulfovibrio</i> sp. OX=885 GN=DCM58_06545 PE=3 SV=1
A0A316D2H6	S-layer family protein OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=C7380_103178 PE=4 SV=1
A0A316D4W3	Uncharacterized protein OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=C7380_103179 PE=4 SV=1
A0A316CZW4	Uncharacterized protein OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=C7380_104119 PE=4 SV=1
A0A1J4T5I9	60 kDa chaperonin OS= <i>Desulfovibrionaceae bacterium</i> CG1_02_65_16 OX=1805130 GN=groL PE=3 SV=1
A0A316CKB2	S-layer family protein OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=C7380_11421 PE=4 SV=1
A0A316CAI5	Carbohydrate ABC transporter substrate-binding protein (CUT1 family) OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=C7380_12910 PE=4 SV=1
A0A2Z6B123	Extracellular solute-binding protein family 1 OS= <i>Desulfovibrio</i> <i>ferrophilus</i> OX=241368 GN=DFE_2501 PE=4 SV=1
A0A316CCY8	Peptide/nickel transport system substrate-binding protein OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=C7380_12429 PE=4 SV=1

A0A316CIE9	Outer membrane protein with beta-barrel domain OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=C7380_11457 PE=4 SV=1
C4XNX9	Uncharacterized protein OS= <i>Desulfovibrio magneticus</i> (strain ATCC 700980 / DSM 13731 / RS-1) OX=573370 GN=DMR_39890 PE=4 SV=1
A0A316D0P5	Peptide/nickel transport system substrate-binding protein OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=C7380_10252 PE=4 SV=1
M1WN94	Molybdenum ABC transporter, periplasmic molybdate-binding protein OS= <i>Pseudodesulfovibrio piezophilus</i> (strain DSM 21447 / JCM 15486 / C1TLV30) OX=1322246 GN=BN4_20178 PE=4 SV=1
E1JV56	Extracellular ligand-binding receptor OS= <i>Desulfovibrio fructosivorans</i> JJ OX=596151 GN=DesfrDRAFT_1505 PE=4 SV=1
A0A212KXY8	Uncharacterized protein OS=uncultured <i>Desulfovibrio</i> sp. OX=167968 GN=KL86DES1_10207 PE=4 SV=1
S7VCJ5	Sulfate adenylyltransferase OS= <i>Desulfovibrio</i> sp. X2 OX=941449 GN=dsx2_1790 PE=4 SV=1
S7TL94	Sulfite reductase, dissimilatory-type beta subunit OS= <i>Desulfovibrio</i> sp. X2 OX=941449 GN=dsx2_0588 PE=4 SV=1
A0A316CYU8	Peptide/nickel transport system substrate-binding protein OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=C7380_10625 PE=4 SV=1
A0A1T4Y6C4	Sulfate adenylyltransferase OS= <i>Desulfovibrio gracilis</i> DSM 16080 OX=1121449 GN=SAMN02745704_02830 PE=4 SV=1
A0A3D4GPA7	Sulfite reductase OS= <i>Desulfovibrio</i> sp. OX=885 GN=DIU49_10595 PE=4 SV=1
A0A316D234	Flagellin OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=C7380_10341 PE=3 SV=1
A0A126QKR6	Sulfate adenylyltransferase OS= <i>Pseudodesulfovibrio indicus</i> OX=1716143 GN=sat PE=4 SV=1
A0A0B1TXG0	Uncharacterized protein OS= <i>Desulfovibrio</i> sp. TomC OX=1562888 GN=NY78_4451 PE=4 SV=1
A0A316MG63	Uncharacterized protein OS= <i>Desulfovibrionaceae</i> bacterium OX=2049043 GN=DBY37_13135 PE=4 SV=1
A0A316C730	Outer membrane protein with beta-barrel domain OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=C7380_1341 PE=4 SV=1
M1WU39	Extracellular ligand-binding receptor OS= <i>Pseudodesulfovibrio piezophilus</i> (strain DSM 21447 / JCM 15486 / C1TLV30) OX=1322246 GN=BN4_20145 PE=4 SV=1
A0A1J5MSP4	Sulfate adenylyltransferase OS= <i>Pseudodesulfovibrio hydrargyri</i> OX=2125990 GN=sat PE=4 SV=1
F3YTT3	60 kDa chaperonin OS= <i>Desulfovibrio africanus</i> str. Walvis Bay OX=690850 GN=groL PE=3 SV=1
A0A316D1D7	Uncharacterized protein OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=C7380_105100 PE=4 SV=1
A0A126QR83	60 kDa chaperonin OS= <i>Pseudodesulfovibrio indicus</i> OX=1716143 GN=groEL PE=3 SV=1
B8J317	Uncharacterized protein OS= <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> (strain ATCC 27774 / DSM 6949) OX=525146 GN=Ddes_0239 PE=4 SV=1
A0A316CID0	Carbohydrate ABC transporter substrate-binding protein (CUT1 family) OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=C7380_1149 PE=4 SV=1

T2GF47	60 kDa chaperonin OS= <i>Desulfovibrio gigas</i> (strain ATCC 19364 / DSM 1382 / NCIMB 9332 / VKM B-1759) OX=1121448 GN=groL PE=3 SV=1
C4XJS4	Uncharacterized protein OS= <i>Desulfovibrio magneticus</i> (strain ATCC 700980 / DSM 13731 / RS-1) OX=573370 GN=DMR_07880 PE=4 SV=1
A0A1G9J979	Peptide/nickel transport system substrate-binding protein OS= <i>Desulfovibrio ferrireducens</i> OX=246191 GN=SAMN05660337_2703 PE=4 SV=1
A0A316D3L1	Uncharacterized protein OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=C7380_105101 PE=4 SV=1
A0A316CXU2	Peptide/nickel transport system substrate-binding protein OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=C7380_1288 PE=4 SV=1
A0A316CHE7	60 kDa chaperonin OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=groL PE=3 SV=1
A0A316D2L3	Carbohydrate ABC transporter substrate-binding protein (CUT1 family) OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=C7380_11818 PE=4 SV=1
A0A1G9C0L5	Uncharacterized protein OS= <i>Desulfovibrio ferrireducens</i> OX=246191 GN=SAMN05660337_0484 PE=4 SV=1
A0A316CJ31	Carbohydrate ABC transporter ATP-binding protein (CUT1 family) OS= <i>Oceanotoga teriensis</i> OX=515440 GN=C7380_11344 PE=3 SV=1