

JÉSSICA FERNANDES CARVALHAIS

**DETECTION AND CONTROL OF *Pseudomonas* USING PHAGE AND PHAGE
PROTEINS**

Thesis presented to the Universidade Federal de Viçosa, as part of the requirements of the Food Science and Technology Graduate Program, to obtain the title of *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL

2019

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

T

C331d
2019

Carvalhais, Jéssica Fernandes, 1991-

Detection and control of *Pseudomonas* using phage and phage proteins / Jéssica Fernandes Carvalhais. – Viçosa, MG, 2019.

xiii, 85f.: il. (algumas color.).

Texto em inglês.

Inclui anexo.

Orientador: Monique Renon Eller.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Tecnologia de Alimentos, 2019.

Inclui bibliografia.

1. *Pseudomonas*. 2. Biofilmes. 3. Controle biológico.
I. Eller, Monique Renon, 1986-. II. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de
Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.
III. Título.

CDD 22 ed. 579.332

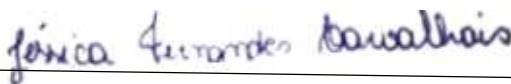
JÉSSICA FERNANDES CARVALHAIS

**DETECTION AND CONTROL OF *Pseudomonas* USING PHAGE AND PHAGE
PROTEINS**

Thesis presented to the Universidade Federal de Viçosa, as part of the requirements of the Food Science and Technology Graduate Program, to obtain the title of *Doctor Scientiae*.

APROVED: July 22th, 2019

Assent:



Jessica Fernandes Carvalho

Author



Monique Renon Eller

(Adviser)

*The greater our knowledge increases the
more our ignorance unfolds.*
John F. Kennedy

*If I have seen further than others, it is by
standing upon the shoulders of giants.*

Isaac Newton

ACKNOWLEDGEMENT

First of all, to God, for the life, the health and the incredible family that He gave me.

To Universidade Federal de Viçosa and Université Laval, for the opportunity, structure, material and technical support.

To FAPEMIG, for the financial support to this research.

To CAPES, for the scholarship to Sandwich PhD.

To my masters and colleagues of the Department of Food Technology for all learning shared. In special to Daniela.

To my adviser Monique, for all teachings, patience and for being one of the best people I've ever met. Her humanity, humility and determination were one of the more important things I have learned. To my co-advisors for their dedication, advice and availability.

To Sylvain Moineau and all his team for receiving me so well in his laboratory and share their resources and structure for this research.

To the colleagues of the Laboratory of Biochemical and Fermentative Processes/LAPROBQI and LAMPOAH - Laboratory of Microbiology of Food and Waterborne Pathogens.

To the Dr.^a Regina Celia S. Mendonça for shared the structure of her laboratory.

To my parents, Genaro and Seila for being always by my side, motivating me and cheering for me. To my brother, my uncles and aunts for being by my side and vibrating with me with every conquest.

To my grandparents, Elca and Nely who taught me the true sense of care and love.

To colleagues who I made during the exchange. In special Alessandra, Cas Hany e Karina.

To my Leonardo, for being always by my side, no matter how difficult the struggles are. You make me strong and loved during that journey.

To all who directly and indirectly contributed to realization of this work my thanks!

SUMMARY

LIST OF ILUSTRATIONS	viii
ABSTRACT.....	x
RESUMO.....	xii
GENERAL INTRODUCTION	1
CAPÍTULO 1.....	2
REVISÃO DE LITERTURA.....	2
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
1. BACTÉRIAS DO GÊNERO <i>PSEUDOMONAS</i>	3
2. PATOGENICIDADE E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	3
3. IMPACTOS E DESAFIOS NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS.....	4
4. <i>PSEUDOMONAS</i> E A FORMAÇÃO DE BIOFILMES	6
5. DETECÇÃO DE CONTAMINANTES EM ALIMENTOS	8
6. BACTERÍÓFAGOS	13
7. REFERENCIAS	15
CHAPTER 2.....	29
DETECTION OF <i>PSEUDOMONAS</i> BY MICROAGGLUTINATION BASED ON THE UFV-P2 PHAGE TAIL FIBER PROTEIN	30
ABSTRACT.....	30
INTRODUCTION	31
MATERIAL AND METHODS	32

microorganisms and culture conditions	32
SEQUENCING AND IDENTIFICATION OF VIRAL PROTEINS	33
CLONING AND EXPRESSION OF THE UFV-P2 TAIL FIBER PROTEIN	33
PROTEIN EXPRESSION	33
PROTEIN QUANTIFICATION.....	34
ASSEMBLY OF THE DETECTION SYSTEM - COVERAGE OF MAGNETIC BEADS WITH THE PHAGE TAIL PROTEINS.....	34
EVALUATION OF THE SENSITIVITY OF THE MICRO-AGGLUTINATION TEST	35
EVALUATION OF THE SPECIFICITY OF THE MICRO-AGGLUTINATION TEST	36
DETECTION OF <i>Pseudomonads</i> BIOFILMS USING THE MICRO- AGGLUTINATION TEST	36
RESULTS.....	37
SEQUENCING OF THE VIRAL PROTEINS	37
PROTEIN EXPRESSION AND QUANTIFICATION.....	37
STANDARDIZATION OF THE AGGLUTINATION TEST	38
SPECIFICITY TEST	38
TIME OF THE RESULT	38
SENSITIVITY TESTS.....	41
DISCUSSION	41
CONCLUSION	43
REFERENCES.....	43

CHAPTER 3.....	48
CONTROLLING PSEUDOMONAD BIOFILM FORMATION USING PHAGE P10 UNDER DYNAMIC AND STATIC CONDITION	49
Abstract	49
INTRODUCTION.....	50
MATERIALS AND METHODS	51
Bacterial strains and materials	51
Growth curve for <i>P. fluorescens</i> in the presence of P10 phages	51
P10 phage adsorption test	51
Actuation of the P10 phage over biofilm formation	52
Biofilm formation in the presence of P10 phages	52
Evaluation of phage P10 activity on pre-formed biofilms	52
Adhered cell counts.....	52
Statistical analysis.....	53
RESULTS	53
Determining phage P10 efficiency against <i>P. fluorescens</i> 1444.....	53
Determining phage P10 efficiency during <i>P. fluorescens</i> biofilm formation	54
Determining phage P10 efficiency in pre-formed biofilms of <i>P. fluorescens</i>	55
DISCUSSION.....	56
CONCLUSION	59
ACKNOWLEDGEMENTS.....	60
REFERENCES	60
DESCRIÇÃO DAS FIGURAS.....	71
DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO.....	72
DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO.....	72
PRODUÇÃO DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE.....	74

LIST OF ILLUSTRATIONS

CHAPTER 1

Quadro 1. Principais proteínas fágicas e suas características.....	14
--	----

CHAPTER 2

Figure 1. Demonstration of the micro-agglutination test.....	35
Figure 2. Sensitivity of the micro-agglutination test.....	35
Figure 3. Protein expression with 0.3 mM IPTG using urea 4M for extraction and protein expression with lactose using guanidine 3M for extraction at 16°C and 37°C	37
Figure 4. Microagglutination test using magnetic <i>beads</i> coated with the UFV-P2 tail fiber protein in the presence.....	38
Figure 5. Evaluation of agglutination test with <i>P. fluorescens</i> suspensions during the time.....	39
Figure 6. Evaluation of agglutination test with <i>P. aeruginosa</i> suspensions during the time.....	40
Figure 7. Evaluation of agglutination test in biofilms.....	40
Figure 8. Evaluation of agglutination test suspensions from swab.....	41

CHAPTER 3

Figure 1. Evaluation of <i>P. fluorescens</i> 1444 growth behavior in the presence of P10 phage and the oscillation of phage concentration during in LB nutrient broth.....	53
Figure 2. Phage P10 adsorption in <i>P. fluorescens</i> 1444 over 30 min.....	54
Figure 3. Number of the adhered cells at different times during biofilm formation when treated with phages.....	55
Figure 4. Number of adhered cells at different times during biofilm formation treated with phages.....	56

ANEXO 1

FIGURA 1. Anotação funcional do genoma do fago UFV-P2.....	81
--	----

FIGURA 2. Plasmídeo Pet23 ^{a+} contendo a sequência da proteína.....	81
TABELA 1. Protein characterization.....	82
FIGURA 3. Teste de aglutinação em diferentes espécies.....	83
FIGURA 4. Teste de aglutinação em <i>P. fluorescens</i>	84
FIGURA 5. Teste de aglutinação em <i>P. aeruginosa</i>	84
Figura 6. Teste de aglutinação em biofilmes de <i>P. fluorescens</i> e <i>P. aeruginosa</i>	85
FIGURA 7. Teste de aglutinação em soluções de <i>swab</i>	85

ABSTRACT

CARVALHAIS, Fernandes Jéssica, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2019. **Detection and control of *Pseudomonas* using phage and phage protein.**
Adviser: Monique Renon Eller.

Bacteria from the genus *Pseudomonas* plays an important role in milk, meat and fish spoilage because it can produce thermo-tolerant lipolytic and proteolytic enzymes, which reduce both the quality and shelf life this product. Besides this, the colonization of these bacteria can in many cases facilitate the colonization of pathogenic bacteria and the formation of biofilms. Chapter 2 aims to develop a rapid technique based on affinity for the identification of *Pseudomonas* in liquid solutions and in biofilms by agglutination. For this, magnetic *beads* were affinity-linked to a structural phage protein from the UFV-P2 phage, that is responsible for recognition and binding to structures in the bacterial cell membrane. This complex formed by the *beads* and the structural phage protein, when in contact with the bacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa* tend to form agglutinates visible to the naked eye. The test developed was able to identify *P. fluorescens* and *P. aeruginosa*. The test developed was able to identify *P. fluorescens* and *P. aeruginosa* in solution after 30 s and 3 min respectively. The tests were negative for *Pseudomonas putida*, *Lactococcus lactis*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. The lowest detectable concentration of *P. fluorescens* in solutions was 10^3 CFU·mL⁻¹ and 10^4 CFU·mL⁻¹ for *P. aeruginosa*. The tests on biofilms of *P. fluorescens* the agglutination was observed in the first minute of contact and in the *P. aeruginosa* biofilms after 2 min. There was no difference in agglutination time in biofilms with 24 and 48 h of formation in both strains analyzed. Biofilms with 72 h showed slower agglutination, presenting a time of agglutination between 4 to 5 min. The agglutination test was negative in biofilms of *E. coli*. The tests with swab solution presented positive agglutination after 3 min of contact. The agglutination test was considered efficient for solutions containing *P. fluorescens* and *P. aeruginosa* also for identification in biofilms on stainless steel coupons. The agglutination test developed was classified as fast response and specific for *P. fluorescens* and *P. aeruginosa*. The development of technologies that allow the rapid detection of

microorganisms is an important strategy for quality control in industries and safety of the population. Chapter 3 of this thesis describes the use of phage P10 to control and prevent biofilm formation. The objective of this study was to evaluate the effects of adding phage P10 during *P. fluorescens* biofilm formation. The effects of P10 on pre-formed biofilm on polystyrene plates after 6 h of contact and over the course of 48 h were also examined. In both cases the phage activity was evaluated under static and dynamic condition at room temperature. The titers of the bacteria and phage were 10^5 CFU·mL⁻¹ and 10^8 PFU·mL⁻¹, respectively. Phage P10 significantly reduced ($p<0.05$) the number of adhered cells during the biofilm formation and in pre-formed biofilm under static and dynamic condition. The phage activity was more effective in younger biofilms. Adding phages during the biofilm formation resulted in an average 2.5-log reduction in the number of adhered cells. When the phages were added to pre-formed biofilm at 12 h, there was a 1.2 log reduction in the number of adhered cells. The use of phage P10 for these purposes is becoming increasingly relevant in terms of pathogenic bacterial resistance to the sanitizers that are traditionally used in food industries. Using the P10 phage to control biofilm formation may be a promising alternative for use in the food industry. The use of phages or their proteins is an important tool for industries and studies that elucidate efficiency and applications in different areas are increasingly relevant. The results of this thesis show that the use of phage and phage proteins has positive results regarding its applicability in biotechnology.

RESUMO

CARVALHAIS, Fernandes Jéssica, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2019. **Deteccção e controle de *Pseudomonas* utilizando bacteriófagos e proteínas fágicas.** Orientadora: Monique Renon Eller.

As bactérias do gênero *Pseudomonas* desempenham um papel importante na deterioração do leite, carne e peixe, pois podem produzir enzimas lipolíticas e proteolíticas termotolerantes, que reduzem tanto a qualidade e o prazo de validade desses alimentos. Além disso, a colonização de outras bactérias pode, em muitos casos, favorecer a colonização de bactérias patogênicas e a formação de biofilmes. O capítulo 2 tem por objetivo desenvolver uma técnica rápida baseada em afinidade para identificação de *Pseudomonas* em soluções líquidas e em biofilmes por aglutinação. Para isso, *beads* magnéticos foram ligados por afinidade a uma proteína fágica estrutural do fago UFV-P2, que é responsável pelo reconhecimento e ligação a estruturas na membrana celular bacteriana. Este complexo formado pelos *beads* e pela proteína estrutural do fago, quando em contato com as bactérias *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas aeruginosa*, tendem a formar aglutinados visíveis a olho nu. O teste desenvolvido foi capaz de identificar *P. fluorescens* e *P. aeruginosa* em solução após 30s e 3min respectivamente. Os testes foram negativos para *Pseudomonas putida*, *Lactococcus lactis*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*. A menor concentração detectável de *P. fluorescens* em soluções foi de 10^3 CFU·mL⁻¹ e 10^4 CFU·mL⁻¹ para *Pseudomonas aeruginosa*. Os testes em biofilme de *Pseudomonas fluorescens* apresentaram aglutinação no primeiro minuto de contato e em biofilmes de *P. aeruginosa* após 2 min. Não houve diferença no tempo de aglutinação em biofilmes com 24 e 48 h de formação nas duas linhagens analisadas, porém biofilmes com 72 h apresentaram aglutinação mais lenta, apresentando um tempo de aglutinação entre 4 a 5 min. O teste de aglutinação foi negativo em biofilmes de *E. coli*. Os testes com solução de *swab* apresentaram aglutinação positiva depois de 3 min de contato. O teste de aglutinação desenvolvido foi considerado eficiente para soluções contendo *P. fluorescens* e *P. aeruginosa* e para identificação em biofilmes formados em cupons de aço inoxidável. O teste de aglutinação desenvolvido foi classificado como de

resposta rápida e específico. O desenvolvimento de tecnologias que permitam a rápida detecção de microrganismos é uma importante estratégia para o controle de qualidade nas indústrias e para a segurança da população. O capítulo 3 desta tese descreve o uso do fago P10 com objetivo de controlar e prevenir a formação de biofilmes. O uso de fagos ou de suas proteínas é uma ferramenta importante para indústrias e estudos que elucidam a eficiência e as aplicações em diferentes áreas são cada vez mais relevantes. Os resultados desta tese mostram que o uso de proteínas fágicas e apresenta resultados positivos quanto à sua aplicabilidade em biotecnologia.

GENERAL INTRODUCTION

The bacteria of the genus *Pseudomonas* play an important role in food spoilage, mainly in milk and milk products, because *Pseudomonas* spp. produce many thermo-tolerant lipolytic and proteolytic enzymes, which reduce both the quality and shelf life of processed milk. This genus is also a great biofilm forming.

The identification of contaminants in the food industry and in several other segments such as hospitals, agriculture and laboratories are the first step to control the spread of contaminants, minimizing economic losses and the risks to the population.

Currently several methods have been developed to meet the need for a rapid response about the presence or absence of contaminating bacteria. However, many of the known methods require a period of propagation and in some cases may take many hours or days. The big challenge is to develop a fast, reliable and easy-to-handle method to detect microorganism.

The use of bacteriophages to identify microorganisms has been intensively explored in many studies in recent years. The specificity of the phages to their host is the premise of the use of these microorganisms in identification tests and in biofilm control. However, extrinsic factors can affect the phage viability and consequently make the test unfeasible. The use of phage proteins presents an alternative to explore the phage specificity independently of its viability.

This work consists of article describing the development of an agglutination test using microspheres based on the specificity of a tail fiber protein for its host (chapter 2). This paper also discusses the efficiency of phage P10 in controlling the formation of biofilms on polystyrene surfaces under dynamic and static conditions (chapter 3). Finally, the annexe 1 presents contain a patent application for the use of *pseudomonas* detection technology based on a microagglutination test based on the affinity of tail fiber protein.



CAPÍTULO 1.

REVISÃO DE LITERTURA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. BACTÉRIAS DO GÊNERO *Pseudomonas*

O gênero *Pseudomonas* é composto por 144 espécies, sendo a grande maioria composta por bactérias gram-negativas, bacilares e pouco exigentes nutricionalmente, requerendo no máximo alguns aminoácidos ou vitaminas do complexo B como fatores de crescimento (Gomila et al. 2015). Algumas espécies deste gênero são patógenas de plantas, animais e humanos, ou responsáveis pela contaminação e deterioração de alimentos (Adams & Moss 2008).

As bactérias deste gênero são descritas como um dos grupos de bactérias mais diversificados do planeta. Consideradas ubíquas, podem ser encontradas em ambientes como solo, matéria orgânica em decomposição, vegetação, água, em ambiente hospitalar, formando associações com plantas (Spiers et al. 2000; Winsor et al. 2011). Têm a capacidade de colonizar uma ampla gama de hospedeiros eucarióticos (Keller-Costa et al. 2014). São classificadas como psicrotróficas, ou seja, têm a capacidade de crescer, mesmo que lentamente, em condições de refrigeração, sendo consideradas um problema principalmente para a indústria de alimentos (James M. Jay 2005).

Esse grupo de bactérias possui também, grande diversidade de sítios de colonização e estes são controlados em sua maioria por *quorum-sensing*. Através deste tipo de comunicação as células podem, por exemplo, estabelecer a formação de biofilmes em determinada superfície (Winstanley and Fothergill 2009).

2. PATOGENICIDADE E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Dentro do gênero *Pseudomonas* são espécies classificadas como patogênicas *P. aeruginosa* e *P. fluorescens* (Scales et al., 2014), sendo *P. aeruginosa* um dos mais importantes agentes causadores de infecções em humanos e *P. fluorescens* um dos principais deterioradores de alimentos (Araby and El-Tablawy 2016).

P. aeruginosa é considerado um patógeno oportunista que atinge preferencialmente pessoas hospitalizadas, pacientes que passaram por

processos cirúrgicos e com queimaduras, pessoas imunodeprimidas e de grupos de risco, como idosos e crianças (Lam et al. 2011; Lovewell et al. 2014; Chowdhury and Bagchi 2016). Dentre as infecções causadas por *P. aeruginosa* podemos destacar infecções urinárias e respiratórias, pneumonias, meningites e endocardites (Venkatesan et al. 2005; Bitsori et al. 2012; Ding et al. 2016).

As infecções por *P. aeruginosa* ocorrem na maioria das vezes pela capacidade dessas bactérias de colonizar a superfície celular e induzir a produção de cápsula polissacarídica, proteases, hemolisina, toxina A e endotoxina (lipopolissacarídeo – LPS) (Higgins et al., 2016; Knoten et al., 2014). Algumas estirpes de *P. aeruginosa* podem também expressar uma citotoxina potente, denominada exoenzima L (ExoU). Essa toxina, após penetrar a célula eucariótica, tem a capacidade de lisar rapidamente essas células, podendo causar infecções agudas (Lee et al. 2007). A produção de exotoxina A e do tipo III por essa espécie também pode causar danos à célula (Yousefi-Avarvand et al., 2015).

De acordo com o Centro de Controle de Doenças (CDC) nos Estados Unidos, no ano de 2016 as infecções por *P. aeruginosa* representaram aproximadamente 10% de todas as infecções hospitalares no país, sendo que 28% dos doentes submetidos a transplante são infectados por esta bactéria e a taxa de mortalidade é próxima dos 50% em pacientes com algum tipo de lesão na pele.

O CDC ainda destaca que são registradas nos Estados Unidos anualmente cerca de 51.000 infecções associadas a *P. aeruginosa* em pacientes hospitalizados, sendo que 13% dessas bactérias são multirresistentes e causam aproximadamente 400 mortes por ano (CDC, 2016).

No Brasil os dados a respeito dos impactos causados por bactérias do gênero *Pseudomonas* ainda são escassos e por isso é difícil calcular os prejuízos causados tanto na área da saúde quanto na indústria de alimentos.

3. IMPACTOS E DESAFIOS NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

Bactérias do gênero *Pseudomonas* possuem importante papel na deterioração de vários alimentos como carnes, peixes resfriados, cereais,

legumes frescos e, principalmente, leite (Parejko et al. 2012; Gardiner et al. 2013; Oliveira et al. 2015; Pinto et al. 2015). Estes impactos estão principalmente relacionados a modificações sensoriais como rancificação, mudanças de cor e textura no leite, putrefação e alteração da cor em carnes e da gema de ovos, sendo também um dos principais grupos de bactérias responsáveis por alterações em pescados, crustáceos e moluscos (Gould 1995; James M. Jay 2005).

A espécie *P. fluorescens* é a principal bactéria associada à contaminação e degradação de alimentos dentro do gênero *Pseudomonas*. Classificada como psicrotrófica, esse espécie se destaca na contaminação e degradação de leite fluido, principalmente pela capacidade de multiplicar e produzir enzimas proteolíticas em temperaturas de refrigeração (James M. Jay 2005; Martins et al. 2015). Outras espécies também associadas à deterioração do leite são *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fragi* e *Pseudomonas maltophilia*, além de *Pseudomonas putrefaciens*, *Pseudomonas gessardii*, *Pseudomonaslundensis*, *Pseudomonas fragi*, e menos frequentemente *P. aeruginosa* (Munsch-Alatossava and Alatossava 2006).

Embora diferentes espécies de *Pseudomonas* sejam encontradas em leite cru, a maioria é composta por organismos termosensíveis. Assim, a deterioração de produtos lácteos termicamente processados é associada principalmente à ação de enzimas termorresistentes (Vithanage et al., 2014; Rakhuba et al., 2010). Enzimas como proteases e lipases resistem aos tratamentos térmicos como pasteurização e UHT e continuam degradando o leite durante o armazenamento (Lo et al., 2015; Zhang et al., 2009; Marchand et al., 2009).

A presença dessas enzimas causa sérios impactos na indústria de alimentos, uma vez que, provocam modificações sensoriais intensas, tornando-os muitas vezes impróprios para o consumo (Marchand et al. 2009; Elmoslemany et al. 2010; Vithanage et al. 2014; Matéos et al. 2015) e ocasionando grandes prejuízos (Brandelli et al. 2009; Mohareb et al. 2015). Já *P. aeruginosa* pode causar mastite em vacas, cabras e ovelhas, causando prejuízos à indústria de processamento de leite e derivados, pela inutilização do leite para o

processamento e gastos com o tratamento clínico dos animais (Atulya et al. 2014; Park et al. 2014; Scaccabarozzi et al. 2015; Wright et al. 2015).

Na indústria de carnes, bactérias do gênero *Pseudomonas* se multiplicam rapidamente, provocando deterioração, produção de compostos voláteis desagradáveis, e modificações na cor (James M. Jay 2005). A degradação ocorre por meio da atividade proteolítica sobre as proteínas sarcoplasmáticas da carne (Ercolini et al., 2009). Nessa matéria-prima destacam-se as espécies *P. fluorescens*, *P. putrefaciens*, *P. lundensis* e *P. putida* como responsáveis pela maioria dos problemas de deterioração (Ercolini et al. 2009).

Pseudomonas também podem causar prejuízos na indústria alimentícia por estarem associadas a doenças que acometem plantas e animais. Por exemplo, *Pseudomonas fuscovaginae* causa doenças na parte superior da planta de arroz prejudicando o desenvolvimento da planta (Quibod et al. 2015), enquanto *Pseudomonas syringae* pv. *porri*, provoca manchas bacterianas em alho-poró (*Allium porrum*), causando problemas no cultivo devido à grande dificuldade de controle pelos métodos convencionais (Rombouts et al. 2016).

Diante dos vários inconvenientes causados por bactérias do gênero *Pseudomonas* na indústria de alimentos e seus riscos eminentes à saúde pública, torna-se crucial encontrar meios eficientes para controle e detecção destes microrganismos de forma rápida visando minimizar os prejuízos causados por eles e garantir a segurança dos produtos comercializados.

4. PSEUDOMONAS E A FORMAÇÃO DE BIOFILMES

Uma das principais causas de deterioração e perdas de produtos *in natura* e processados consiste na contaminação dos alimentos devido a microrganismos aderidos sobre a superfície de equipamentos da linha produtiva. A indústria de processamento de alimentos utiliza uma variedade de materiais como aço inox, vidro, borracha, polipropileno, ferro, poliestireno de baixa densidade, policarbonato, entre outros, que podem servir de base para a formação de biofilmes bacterianos (Jun et al. 2010).

A formação do biofilme é uma das estratégias de sobrevivência de microrganismos. Ela se dá por meio da adesão microbiana em superfícies

bióticas ou abióticas, a qual oferece aos microrganismos que compõem o biofilme proteção contra agentes antimicrobianos e co-operabilidade metabólica (Kokare et al. 2009). Esta adesão é mediada por interações físico-químicas em que, inicialmente, os microrganismos aderem de forma reversível e, em seguida, adsorvem de forma irreversível nessa superfície, onde iniciam a síntese de uma matriz exopolissacarídica (Van Loosdrecht et al. 1995; Flemming and Wingender 2010; Kishen and Haapasalo 2010).

Algumas bactérias do gênero *Pseudomonas* possuem a capacidade de formar biofilmes complexos, com destaque para as espécies *P. fluorescens* e *P. aeruginosa*. A formação de biofilmes em cateteres por essa bactéria em ambientes hospitalares é um grande desafio para área da saúde. A formação de biofilmes também está associada com quadros clínicos graves de infecção (Savoia, 2014; Jakobsen et al., 2013; Mah, 2012) como, por exemplo, infecções pulmonares crônicas em pacientes com fibrose cística devido a formação de biofilme no tecido pulmonar podendo até mesmo levar a óbito (Høiby et al. 2010; Chotirmall et al. 2012; Varga et al. 2015).

Cappitelli e colaboradores destacam diversos prejuízos que a formação de biofilmes pode representar para a indústria de alimentos, como a diminuição da eficiência dos procedimentos de limpeza, levando à contaminação do produto por bactérias aderidas, corrosão de metais em tubulações e tanques, redução da eficácia de transferência de calor ou até mesmo obstrução do equipamentos, podendo culminar na deterioração dos alimentos e veiculação de doenças (Cappitelli et al. 2014).

Uma característica interessante dos microrganismos presentes nos biofilmes consiste na resistência adquirida por essas células a diversos produtos químicos e antibióticos, consequentemente dificultando a sua eliminação dessas superfícies (Marcinkiewicz et al. 2013; Abdallah et al. 2014; Olsen 2015). É comum que as bactérias que compõem o biofilme sejam catalisadoras de reações químicas que causem a corrosão metálica em equipamentos em indústria de alimentos, equipamentos utilizados em hospitais e em tubulações de tratamento de água, causando prejuízos e problemas de saúde pública (Usher et al. 2014; Zhang et al. 2015).

Vale ressaltar que biofilmes pré-formados podem propiciar a deposição de outros microrganismos que podem causar doenças e a deterioração de alimentos como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *E. coli* O157:H7. Estas associações tornam o biofilme mais resistente a agentes de limpeza, antibióticos e até mesmo à ação mecânica (Bae et al. 2012; Bodur and Cagri-Mehmetoglu 2012; Puga et al. 2016; Lee et al. 2016).

O desafio em combater a multiplicação de bactérias do gênero *Pseudomonas* e consequentemente a formação de biofilmes por elas é bem conhecido pela indústria de alimentos. Para tanto é essencial estratégias para a rápida identificação dos microrganismos que compõem esta matriz.

5. DETECÇÃO DE CONTAMINANTES EM ALIMENTOS

A detecção de agentes patogênicos em alimentos e superfícies na indústria é essencial para garantir a segurança alimentar em todas as etapas de produção e distribuição (Brigati et al. 2007; Mandal et al. 2011). Mesmo diante dos avanços na aplicação de medidas de higiene e controle na indústria, a contaminação de alimentos por patógenos continua sendo uma ameaça para a saúde pública (Schmelcher and Loessner 2014a).

Os sintomas de infecções causadas por ingestão de alimentos contaminados podem se manifestar em alguns casos de forma relativamente rápida (Welker et al. 2010). Diante disso é fundamental o desenvolvimento de métodos de análises com resultados cada vez mais rápidos e precisos. A seleção de métodos adequados para a detecção de microrganismos específicos deve considerar como principais critérios a sensibilidade da análise, o tempo de detecção, os custos associados e a especificidade do ensaio (Jasson et al. 2010).

As análises microbiológicas tradicionais se baseiam na identificação de microrganismos por características fenotípicas verificadas por meio de microscopia e meios diferenciais, testes bioquímicos e imunológicos. Muitas vezes são necessárias etapas de enriquecimento e pré-análises que demandam tempo e recursos, tornando alguns destes métodos caros, demorados e laboriosos (Mandal et al. 2011). A aplicação da técnica de contagem em placas, por exemplo, exige horas para preparação de materiais, emprego de mão-de-

obra qualificada e pode levar entre 48 a 72 h para que sejam obtidos resultados preliminares. Entretanto esta técnica é considerada sensível e permite que as colônias possam ser recuperadas e usadas como fonte de rastreamento (Jasson et al. 2010).

Uma das técnicas alternativas à contagem padrão em placas consiste na utilização de placas *Petrifilm*[®] (3M[™]) (Miranda et al. 2011), que consistem em uma película fina de plástico que contém os nutrientes e componentes ideais para o crescimento muitas vezes exclusivo do microrganismo-alvo. O uso de placas *Petrifilm*[®] reduz substancialmente a necessidade de preparação de materiais, viabilizando o controle microbiano mesmo em locais com menor estrutura laboratorial e reduzindo custos. Os resultados são obtidos em 24-48 h, mas etapas de enriquecimento podem ser necessárias (Samarajeewa et al. 2010; Sokolov et al. 2011; Cameron et al. 2013).

O *Compact Dry*[®] é uma técnica simples e segura que permite determinar e quantificar microrganismos em alimentos ou em outras matérias-primas. Nesta técnica uma pequena quantidade de amostra é colocada sobre as placas que são incubadas de acordo com a temperatura especificada nas bulas. As colônias crescidas são pigmentadas com cores diferentes, desenvolvidas por substratos cromogénicos e indicadores redox. O tipo de bactéria é identificado pela cor. Como vantagens dessa técnica podemos destacar a facilidade de manuseio, necessidade de pouco espaço e a possibilidade das amostras serem conservadas a temperatura ambiente por até 24 h, além de possuírem ampla faixa de temperatura variando de 20 – 42°C (Kodaka et al. 2006; Uyar et al. 2011).

Outra forma de identificação de microrganismos é por meio do método de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) no qual anticorpos imobilizados em placas sensibilizadas de poliestireno podem detectar o microrganismo ou proteínas dos mesmos presentes na amostra. Em geral a técnica é rápida, sensível, específica e disponível em kits. Entretanto alguns kits comerciais podem apresentar falhas na detecção (falsos-negativos). Estudos demonstram que este método é eficiente para detecção de diferentes estirpes de *Salmonella* em leite, soro, aves e até mesmo em pacientes contaminados por essa bactéria (Nyman et al. 2013; Brooks et al. 2014). *Pseudomonas aeruginosa* também pode

ser identificada por este método em pacientes com infecções pulmonares (Mauch et al. 2014).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) já foi afirmada como uma das técnicas mais abrangentes e confiáveis para identificação de organismos. Essa técnica permite a amplificação específica *in vitro* de sequências definidas de DNA, não sendo necessário, para isto, conhecer a estrutura completa do DNA alvo, mas apenas as sequências que flanqueiam a região a ser amplificada (Chuang et al. 2013; Garibyan and Avashia 2013). A técnica demonstra maior especificidade quando comparada com os métodos microbiológicos tradicionais. A duração dessa análise pode chegar a aproximadamente 3 horas, porém, ao se considerar o tempo de preparo prévio, este tempo pode estender-se por até três dias (Chiou et al. 2015).

Já a técnica de PCR quantitativo (ou PCR em tempo real) é uma variação da técnica de PCR, a qual permite que a amplificação e detecção ocorram simultaneamente. O resultado é visualizado em tempo real durante a amplificação da sequência de interesse, com capacidade ainda de gerar resultados quantitativos com maior precisão. Durante a amplificação, a quantificação é determinada pela quantidade de produto amplificado durante cada ciclo, através da fluorescência emitida. Esta metodologia utiliza um equipamento com sistema de monitoramento da emissão da fluorescência. Essa técnica pode ser útil para a quantificação de microrganismos não cultiváveis a partir das mais variadas fontes. A técnica só falha em não diferenciar microrganismos vivos dos mortos (Slimani et al. 2012). Entretanto, alguns estudos mostram que a utilização de brometo de etídeo monoazida reduz esse erro, uma vez que o corante só se liga ao material genético de células mortas, impedindo que esse seja amplificado (Delgado-viscogliosi et al. 2009; Kroh et al. 2010; Hayden et al. 2013).

A técnica de PCR vem sofrendo diversas modificações ao longo dos anos e Notomi e colaboradores, em 2000, desenvolveram um novo método de amplificação, onde se obtém uma quantidade de DNA amplificado em escala exponencial denominada LAMP (*Loop Mediated Isothermal Amplification*). A técnica de LAMP é uma técnica de amplificação de DNA sem uso de

termocicladores, em temperatura constante, que devido à sua simplicidade, robustez e baixo custo, pode ser útil no diagnóstico de microrganismos (Notomi 2000).

O uso de métodos baseados em fluorescência e bioluminescência como um dispositivo de detecção rápida de microrganismos tem se tornado uma tendência, uma vez que permitem o desenvolvimento de metodologias altamente sensíveis e muitas vezes portáteis (Vinay et al. 2015).

Yang e colaboradores confirmaram a eficiência dos ensaios baseados em bioluminescência na detecção rápida de *Salmonella* em alimentos e em rações para animais associados à técnicas (LAMP), PCR em tempo real e bioluminescência (Yang et al. 2016).

Os mesmos autores em um estudo anterior compararam a técnica de amplificação isotérmica e a técnica de PCR observando que ambos foram rápidos, precisos e confiáveis para detectar sorovares de *Salmonella* em casca de ovos e sugeriu o uso destas técnicas em análises de rotina para *Salmonella* em ovos (Yang et al. 2013).

Outras técnicas de identificação de microrganismos que vêm ganhando espaço no mercado são as que envolvem aglutinação e micro-aglutinação baseado na junção com um antígeno ou anticorpo. Pode-se preparar suspensões contendo a amostra a ser analisada e um anticorpo específico, de modo que, é possível observar aglomerados de células quando o resultado é positivo (Jenkins et al. 1997; Adler et al. 2010; Blanco et al. 2016).

Estes tipos de ensaios são ferramentas eficientes para satisfazer essas necessidades do mercado atual por serem relativamente baratos, portáteis, possuírem estabilidade química, alta sensibilidade, reprodutibilidade e especificidade, podendo ainda ser utilizados em ambientes não laboratoriais (Love and Sobsey 2007; Qin et al. 2015).

Mahat e colaboradores descrevem outras vantagens de trabalhar com testes de aglutinação como o fato de poderem ser usados de forma qualitativa e semiquantitativa, sendo em geral, de boa reprodutibilidade e apresentam resultados visíveis a olho nu após cerca de 3 min de contato com a amostra (Mahat et al. 2014)

Ortika e colaboradores avaliaram possíveis interferentes na eficiência em testes de aglutinação e demonstraram que o uso de tensoativos no processo de lavagem, bem como, mudanças de pH e nas concentrações de soluções tampão não interferem na eficiência dos testes de aglutinação (Ortika et al. 2013).

Esse tipo de teste já é utilizado em indicadores de contaminação fecal como uma ferramenta de monitoramento e gerenciamento da qualidade da água, assim como em consultórios médicos e veterinários, laboratórios de microbiologia de diagnóstico clínico e laboratórios de virologia para detectar diferentes microrganismos (Lee et al. 2014; Levinson et al. 2015).

Testes de diagnósticos também são realizados utilizando microesferas de poliestireno, ouro ou de material magnético como base em reações imunológicas. Estas microesferas são também conhecidas como *beads*, partículas de polímeros esféricos de diferentes tamanhos e com composição variada (Fujimura 2010). Em geral essas microesferas apresentam superfícies com moléculas ativas com diferentes grupamentos químicos que possibilitam ligações de substâncias variadas como anticorpos que possibilitam a identificação de moléculas (Peula-García et al. 2002; Gehring et al. 2004). Uma das principais vantagens da utilização de microesferas (*beads*) é que no mercado estão disponíveis comercialmente de diversos tamanhos, variando de nanopartículas (50 nm) para micropartículas (até 20 µm) o que possibilita a utilização em investigação de imunologia celular (*beads* menores - 50 nm) e quando conjugados com anticorpos separam alvos (*beads* maiores - 1-5 µm), com o objetivo de potencializar desempenho dos testes ELISA, aumentando a sensibilidade e reduzindo o tempo de incubação necessário (Fujimura 2010).

Diante do apresentado, a utilização de biosensores tem demonstrado ser uma alternativa vantajosa uma vez que os resultados são rápidos, os custos são relativamente baixos e em sua maioria fáceis de manipular não sendo, portanto, necessário pessoal altamente treinado (Izadi et al. 2016).

6. BACTERIÓFAGOS

A utilização de bacteriófagos vem sendo estudada ao longo dos anos como uma ferramenta eficiente no controle de patógenos, como em antibacterianos, além de aplicações industriais. É notável a crescente aceitação de sua utilização por órgãos de regulamentação e fiscalização, seja na indústria de alimentos e em ambientes clínicos para controle biológico (Cademartiri et al. 2010). O potencial dos fagos também tem sido relatado na produção de vacinas e detecção de bactérias (Bakhshinejad 2014; Krylov 2014; Alcaine et al. 2016).

Métodos que utilizam partículas infectivas de fagos para a detecção de patógenos são em geral rápidos e sensíveis, além de diferenciarem células bacterianas viáveis e não viáveis (Hagens et al. 2011; Zou et al. 2016; Alcaine et al. 2016). Outra vantagem é a robustez do ensaio e a alta especificidade do fago, muitas vezes eliminando a necessidade de enriquecimento prévio da amostra (Gervais et al. 2007).

O uso de bioengenharia para criar sistemas de detecção de baixo custo, rápido, e sensíveis tem crescido substancialmente (Schmelcher and Loessner 2014a; Alcaine et al. 2016).

Alguns sistemas de detecção utilizando fagos se baseiam na adição de um gene repórter ao genoma viral, principalmente os genes *lux*. Assim após a infecção de uma célula alvo o gene é expresso pela célula hospedeira e o produto detectado (Brigati et al. 2007; Klumpp and Loessner 2014). Isso é possível devido à especificidade de algumas proteínas de cauda dos fagos, também conhecidas como TSPs (*tailspike proteins*), com receptores específicos na membrana de bactérias (Bai et al. 2016). Desta forma essas proteínas podem ser utilizadas para detecção seletiva de microrganismos (Singh et al. 2010; Tay et al. 2012; Schmelcher and Loessner 2016). Sistemas de detecção baseados nas TSPs isoladas não causam a lise da bactéria, possuem uma maior superfície de contato ativa e maior estabilidade a fatores extrínsecos quando comparados a sistemas usando fagos (Poshtiban et al. 2013). Além disso, a utilização de fagos pode levar à seleção de bactérias resistentes à infecção e dificultar o reconhecimento dos receptores da membrana celular da bactéria (James M. Jay 2005).

Proteínas de fagos também podem ser usadas para as mais diversas funções em biotecnologia. O quadro a seguir destaca as principais proteínas fágicas com potencial aplicação biotecnológica e suas características gerais.

Quadro 1. Principais proteínas fágicas e suas características

Proteínas fágicas e características		
Proteína	Características/ atividade	Referência
Depolimerase	Eficientes no combate a biofilmes bacterianos.	(Roach and Donovan 2015).
Endolisina	Hidrolizam o peptidoglicano da parede celular	Drulis-Kawa et al., 2012.
Lisina	Hidrolizam ligações covalentes presentes na parede celular bacteriana, promovendo lise da bactéria.	Drulis-Kawa et al., 2012.
Holina	Formam poros na membrana celular, causando a permeabilização da membrana e acesso de outras enzimas ao peptidoglicano.	Bruggemann and Lood, 2013.
CII e CIII	Atuam na regulação do ciclo lisogênico.	Casjens and Hendrix, 2015; Kobilier et al., 2007.
Gam	Se ligam a proteínas da iniciação da replicação (RecBCD) e inibem a atividade das helicases e nucleases e por isso tem papel importante na regulação da replicação. Também transportam determinantes genéticos que regulam negativamente a transcrição de genes que codificam os componentes do sistema de secreção de tipo III em <i>E. coli</i> .	Tozzoli et al., 2014; Court et al., 2007.

Grandes empresas têm desenvolvido produtos derivados de proteínas fágicas associadas a técnicas imunológicas, buscando rapidez e praticidade em testes de detecção.

O kit de detecção *VidasUp*[®] (comercializado pela bioMérieux Industry, França) utiliza proteínas recombinantes específicas para detecção de patógenos. O kit é extremamente simples e rápido e oferece resultados entre 8 e 24 h e já

está disponível para detecção de *Salmonella*, *Listeria* e *Escherichia coli*. Esses métodos já foram validados por órgãos internacionais como *Official Methods of Analysis* (AOAC), *Association Française de Normalisation* (AFNOR) (Bird et al. 2013; Crowley et al. 2014).

O fago UFV-P2 foi isolado em 2011 pelo Laboratório de Imunovirologia Molecular a partir de água de descarte de uma indústria de produtos lácteos e mostrou grande potencial em retardar a proteólise por *P. fluorescens* em leite desnatado reconstituído, mesmo em altas concentrações dessa bactéria. Além de ensaios de caracterização estrutural, foram realizados o sequenciamento e a análise de seu genoma (Eller et al., 2013), no qual foram encontradas 75 ORFs putativas, dentre as quais se destaca a proteína da fibra da cauda (ORF 65: 21,9 kDa). Em bacteriófagos, essa proteína é a principal responsável pelo reconhecimento e adsorção ao hospedeiro, o que a torna uma interessante ferramenta em estratégias para detecção de bactérias (Singh et al., 2010).

Assim, um kit de diagnóstico baseado na interação entre as proteínas do fago UFV-P2 acopladas a um sistema de microaglutinação poderia fornecer resultados com rapidez, especificidade e sensibilidade, características encontradas nos sensores biológicos.

7. REFERENCIAS

Abdallah M, Benoliel C, Drider D, et al (2014) Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Arch. Microbiol.* 196:453–472.

Adams MR, Moss MO (2008) *Food Microbiology*.

Adler B, Pena de la, Moctezuma A (2010) *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol* 140:287–296. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.03.012

Alcaine SD, Law K, Ho S, et al (2016) Bioengineering bacteriophages to enhance the sensitivity of phage amplification-based paper fluidic detection of bacteria. *Biosens Bioelectron* 82:14–19. doi: 10.1016/j.bios.2016.03.047

Araby E, El-Tablawy SY (2016) Inhibitory effects of rosemary (*Rosemarinus*

officinalis L.) essential oil on pathogenicity of irradiated and non-irradiated *Pseudomonas aeruginosa*. J Photochem Photobiol B Biol 159:24–32. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.02.024

Atulya M, Jesil Mathew A, Venkata Rao J, Mallikarjuna Rao C (2014) Influence of milk components in establishing biofilm mediated bacterial mastitis infections in cattle: A fractional factorial approach. Res Vet Sci 96:25–27. doi: 10.1016/j.rvsc.2013.12.001

Bae YM, Baek SY, Lee SY (2012) Resistance of pathogenic bacteria on the surface of stainless steel depending on attachment form and efficacy of chemical sanitizers. Int J Food Microbiol 153:465–473. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.017

Bai J, Kim Y, Ryu S, Lee J (2016) Biocontrol and Rapid Detection of Food-borne Pathogens Using Bacteriophages and Endolysins. Front Microbiol 7:474. doi: 10.3389/fmicb.2016.00474

Bakhshinejad B (2014) Bacteriophages and their applications in the diagnosis and treatment of hepatitis B virus infection. World J Gastroenterol 20:11671. doi: 10.3748/wjg.v20.i33.11671

Bird P, Fisher K, Boyle M, et al (2013) Evaluation of VIDAS UP *Salmonella* (SPT) assay for the detection of *Salmonella* in a variety of foods and environmental samples: collaborative study. J AOAC Int 96:808–821. doi: 10.5740/jaoacint.CS2013_01

Bitsori M, Maraki S, Koukouraki S, Galanakis E (2012) *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract infection in children: Risk factors and outcomes. J Urol 187:260–264. doi: 10.1016/j.juro.2011.09.035

Blanco RM, dos Santos LF, Galloway RL, Romero EC (2016) Is the microagglutination test (MAT) good for predicting the infecting serogroup for leptospirosis in Brazil Comp Immunol Microbiol Infect Dis 44:34–36. doi: 10.1016/j.cimid.2015.12.003

Bodur T, Cagri-Mehmetoglu A (2012) Removal of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157: H7 biofilms on stainless steel

using scallop shell powder. Food Control 25:1–9. doi: 10.1016/j.foodcont.2011.09.032

Brandelli A, Nörnberg MDFBL, Tondo EC (2009) Bactérias psicotróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. Acta Sci Vet 37:157–163.

Brigati JR, Ripp SA, Johnson CM, et al (2007) Bacteriophage-based bioluminescent bioreporter for the detection of *Escherichia coli* 0157:H7. J Food Prot 70:1386–1392.

Brooks BW, Lutze-Wallace CL, Devenish J, et al (2014) Comparison of an antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay with bacterial culture for detection of *Salmonella* in poultry-hatchery environmental samples. Can J Vet Res 78:68–71.

Cademartiri R, Anany H, Gross I, et al (2010) Immobilization of bacteriophages on modified silica particles. Biomaterials 31:1904–1910. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.11.029

Cameron M, Keefe GP, Roy JP, et al (2013) Evaluation of a 3M Petrifilm on-farm culture system for the detection of intramammary infection at the end of lactation. Prev Vet Med 111:1–9. doi: 10.1016/j.prevetmed.2013.03.006

Cappitelli F, Polo A, Villa F (2014) Biofilm Formation in Food Processing Environments is Still Poorly Understood and Controlled. Food Eng. Rev. 6:29–42.

Casjens SR, Hendrix RW (2015) Bacteriophage lambda: Early pioneer and still relevant. Virology 479–480:310–330. doi: 10.1016/j.virol.2015.02.010

Chiou J, Leung AHH, Lee HW, Wong W (2015) Rapid testing methods for food contaminants and toxicants. J Integr Agric 14:2243–2264. doi: 10.1016/S2095-3119(15)61119-4

Chotirmall SH, Smith SG, Gunaratnam C, et al (2012) Effect of Estrogen on *Pseudomonas Mucoide* and Exacerbations in Cystic Fibrosis. N Engl J Med 366:1978–1986. doi: 10.1056/nejmoa1106126

Chowdhury N, Bagchi A (2016) Molecular insight into the activity of LasR protein from *Pseudomonas aeruginosa* in the regulation of virulence gene expression by this organism. Gene 580:80–87. doi: 10.1016/j.gene.2015.12.067

Chuang L-Y, Cheng Y-H, Yang C-H (2013) Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnol Lett* 35:1541–1549. doi: 10.1007/s10529-013-1249-8

Crowley E, Bird P, Flannery J, et al (2014) Evaluation of VIDAS® UP *Listeria* assay (LPT) for the detection of *Listeria* in a variety of foods and environmental surfaces: First action 2013.10. *J AOAC Int* 97:431–441. doi: 10.5740/jaoacint.13-372

Delgado-viscogliosi P, Solignac L, Delattre J (2009) Viability PCR , a Culture-Independent Method for Rapid and Selective Quantification of Viable *Legionella pneumophila* Cells in Environmental Water Samples □. 75:3502–3512. doi: 10.1128/AEM.02878-08

Ding C, Yang Z, Wang J, et al (2016) Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* and antimicrobial-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients with pneumonia in mainland China: A systematic review and meta-analysis. *Int. J. Infect. Dis.* 49:119–128.

Drulis-Kawa Z, Majkowska-Skrobek G, Maciejewska B (2015) Bacteriophages and phage-derived proteins--application approaches. *Curr Med Chem* 22:1757–73. doi: 10.2174/0929867322666150209152851

Eller MR, Salgado RL, Vidigal PMP, et al (2013) Complete Genome Sequence of the *Pseudomonas fluorescens* Bacteriophage UFV-P2. *Genome Announc.* doi: 10.1128/genomeA.00006-12

Elmoslemamy AM, Keefe GP, Dohoo IR, et al (2010) The association between bulk tank milk analysis for raw milk quality and on-farm management practices. *Prev Vet Med* 95:32–40. doi: 10.1016/j.prevetmed.2010.03.007

Ercolini D, Russo F, Nasi A, et al (2009) Mesophilic and psychrotrophic bacteria from meat and their spoilage potential in vitro and in beef. *Appl Environ Microbiol* 75:1990–2001. doi: 10.1128/AEM.02762-08

Flemming H, Wingender J (2010) The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8:623–33. doi: 10.1038/nrmicro2415

Fujimura PT (2010) SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS MIMÉTICOS A PROTEÍNAS TUMORAIS NO ESTADIAMENTO CLÍNICO-

PATOLÓGICO DO CÂNCER DE PRÓSTATA. Uberlândia – MG

Gardiner DM, Stiller J, Covarelli L, et al (2013) Genome Sequences of *Pseudomonas* spp. Isolated from Cereal Crops. *Genome Announc* 1:e00209-13-e00209-13. doi: 10.1128/genomeA.00209-13

Garibyan L, Avashia N (2013) Polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol* 133:e6. doi: 10.1038/jid.2013.1

Gehring AG, Irwin PL, Reed SA, et al (2004) Enzyme-linked immunomagnetic chemiluminescent detection of *Escherichia coli* O157:H7. *J Immunol Methods* 293:97–106. doi: 10.1016/j.jim.2004.07.004

Gervais L, Gel M, Allain B, et al (2007) Immobilization of biotinylated bacteriophages on biosensor surfaces. *Sensors Actuators, B Chem* 125:615–621. doi: 10.1016/j.snb.2007.03.007

Gomila M, Pea A, Mulet M, et al (2015) Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Front Microbiol* 6:1–13. doi: 10.3389/fmicb.2015.00214

Gould GW (1995) Biodeterioration of foods and an overview of preservation in the food and dairy industries. *Int Biodeterior Biodegradation* 36:267–277. doi: 10.1016/0964-8305(95)00101-8

Hagens S, de Wouters T, Vollenweider P, Loessner MJ (2011) Reporter bacteriophage A511:: celB transduces a hyperthermostable glycosidase from *Pyrococcus furiosus* for rapid and simple detection of viable *Listeria* cells. *Bacteriophage* 1:143–151. doi: 10.4161/bact.1.3.16710

Hayden RT, Gu Z, Ingersoll J, et al (2013) Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantitative detection of cytomegalovirus. *J Clin Microbiol* 51:540–546. doi: 10.1128/JCM.02620-12

Higgins G, Fustero Torre C, Tyrrell J, et al (2016) Lipoxin A4 prevents tight junction disruption and delays the colonisation of cystic fibrosis bronchial epithelial cells by *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* ajplung.00368.2015. doi: 10.1152/ajplung.00368.2015

Høiby N, Ciofu O, Bjarnsholt T (2010) *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiol* 5:1663–1674. doi: 10.2217/fmb.10.125

Izadi Z, Sheikh-Zeinoddin M, Ensafi AA, Soleimani-Zad S (2016) Fabrication of an electrochemical DNA-based biosensor for *Bacillus cereus* detection in milk and infant formula. *Biosens Bioelectron* 80:582–589. doi: 10.1016/j.bios.2016.02.032

Jakobsen TH, Bjarnsholt T, Jensen PØ, et al (2013) Targeting quorum sensing in. *Future Microbiol* 901–921.

James M. Jay (2005) *Microbiologia de Alimentos* 6ªEd. In: Artmed. <http://www.editoraufv.com.br/produto/1594392/microbiologia-de-alimentos-6ed>.

Jasson V, Jacxsens L, Luning P, et al (2010) Alternative microbial methods : An overview and selection criteria. *Food Microbiol* 27:710–730. doi: 10.1016/j.fm.2010.04.008

Jenkins P, Barnes RA, Coakley WT (1997) Detection of meningitis antigens in buffer and body fluids by ultrasound-enhanced particle agglutination. *J Immunol Methods* 205:191–200. doi: 10.1016/S0022-1759(97)00076-8

Jun W, Kim MS, Cho BK, et al (2010) Microbial biofilm detection on food contact surfaces by macro-scale fluorescence imaging. *J Food Eng* 99:314–322. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2010.03.005

Keller-Costa T, Jousset A, Van Overbeek L, et al (2014) The freshwater sponge *Ephydatia fluviatilis* harbours diverse *Pseudomonas* species (Gammaproteobacteria, Pseudomonadales) with broad-spectrum antimicrobial activity. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0088429

Kishen A, Haapasalo M (2010) Biofilm models and methods of biofilm assessment. *Endod Top* 22:58–78. doi: 10.1111/j.1601-1546.2012.00285.x

Klumpp J, Loessner MJ (2014) Detection of bacteria with bioluminescent reporter bacteriophage. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 144:155–171.

Knoten CA, Wells G, Coleman JP, Pesci EC (2014) A conserved suppressor mutation in a tryptophan auxotroph results in dysregulation of *Pseudomonas*

quinolone signal synthesis. J Bacteriol 196:2413–2422. doi: 10.1128/JB.01635-14

Kodaka H, Teramura H, Nirazuka T, Mizuochi S (2006) Comparison of the Compact Dry CF with the most probable number method (AOAC official method 966.24) for enumeration of coliform bacteria in raw meats Performance-Tested Method SM 110401. J AOAC Int 89:115–126.

Kokare CR, Chakraborty S, Khopade AN, Mahadik KR (2009) Biofilm: Importance and applications. Indian J. Biotechnol. 8:159–168.

Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M (2010) Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). Methods 50:298–301. doi: 10.1016/j.ymeth.2010.01.032

Krylov VN (2014) Bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa*: long-term prospects for use in phage therapy. Adv Virus Res 88:227–78. doi: 10.1016/B978-0-12-800098-4.00005-2

Lam JS, Taylor VL, Islam ST, et al (2011) Genetic and Functional Diversity of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide. Front Microbiol 2:118. doi: 10.3389/fmicb.2011.00118

Lee HS, Kwon M, Heo S, et al (2017) Characterization of the Biodiversity of the Spoilage Microbiota in Chicken Meat Using Next Generation Sequencing and Culture Dependent Approach. Korean J Food Sci Anim Resour 37:535–541. doi: 10.5851/kosfa.2017.37.4.535

Lee M-N, Kim S-K, Li X-H, Lee J-H (2014) Bacterial virulence analysis using brine shrimp as an infection model in relation to the importance of quorum sensing and proteases. J Gen Appl Microbiol 60:169–174. doi: 10.2323/jgam.60.169

Lee SHI, Cappato LP, Corassin CH, et al (2016) Effect of peracetic acid on biofilms formed by *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* isolated from dairy plants. J Dairy Sci 99:2384–2390. doi: 10.3168/jds.2015-10007

Lee VT, Pukatzki S, Sato H, et al (2007) Pseudolipase A is a specific inhibitor for phospholipase A2 activity of *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU. Infect Immun 75:1089–1098. doi: 10.1128/IAI.01184-06

- Levinson KJ, Jesus M De, Mantis NJ (2015) Rapid effects of a protective O-polysaccharide-specific monoclonal IgA on *Vibrio cholerae* agglutination, motility, and surface morphology. *Infect Immun* 83:1674–1683. doi: 10.1128/IAI.02856-14
- Lo R, Stanton-cook MJ, Beatson SA, Turner MS (2015) Draft Genome Sequence of *Pseudomonas fluorescens* SRM1 , an Isolate from Spoiled Raw Milk. *Genome Announc* 3:10–11. doi: 10.1128/genomeA.00138-15. Copyright
- Love DC, Sobsey MD (2007) Simple and rapid F+ coliphage culture, latex agglutination, and typing assay to detect and source track fecal contamination. *Appl Environ Microbiol* 73:4110–4118. doi: 10.1128/AEM.02546-06
- Lovewell RR, Patankar YR, Berwin B (2014) Mechanisms of phagocytosis and host clearance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 306:L591-603. doi: 10.1152/ajplung.00335.2013
- Mah T-F (2012) Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future Microbiol* 7:1061–1072. doi: 10.2217/fmb.12.76
- Mahat M, Abdullah WZ, Che Hussin CM (2014) Conventional Rapid Latex Agglutination in Estimation of von Willebrand Factor: Method Revisited and Potential Clinical Applications. *J Immunol Res* 2014:1–10. doi: 10.1155/2014/850810
- Mandal PK, Biswas AK, Choi K, Pal UK (2011) Methods for Rapid Detection of Foodborne Pathogens: An Overview. *Am. J. Food Technol.* 6:87–102.
- Marchand S, Vandriesche G, Coorevits A, et al (2009) Heterogeneity of heat-resistant proteases from milk *Pseudomonas* species. *Int J Food Microbiol* 133:68–77. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.027
- Marcinkiewicz J, Strus M, Pasich E (2013) Antibiotic resistance : a “dark side” of biofilm - associated chronic infections. *Pol Arch Med Wewn* 123:309–313.
- Martins ML, De Araújo EF, Mantovani HC, et al (2005) Detection of the apr gene in proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. *Int J Food Microbiol* 102:203–211. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.016
- Martins ML, Pinto UM, Riedel K, Vanetti MCD (2015) Milk-deteriorating exoenzymes

from *Pseudomonas fluorescens* 041 isolated from refrigerated raw milk. Brazilian J Microbiol 46:207–217. doi: 10.1590/S1517-838246120130859

Matéos a., Guyard-Nicodème M, Baglinière F, et al (2015) Proteolysis of milk proteins by AprX, an extracellular protease identified in *Pseudomonas* LBSA1 isolated from bulk raw milk, and implications for the stability of UHT milk. Int Dairy J 49:78–88. doi: 10.1016/j.idairyj.2015.04.008

Mauch R, Rossi C, Ribeiro J, et al (2014) Assessment of IgG antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Diagn Pathol 9:1–7. doi: 10.1186/s13000-014-0158-z

Miranda RO, Neto GG, de Freitas R, et al (2011) Enumeration of bifidobacteria using Petrifilm AC in pure cultures and in a fermented milk manufactured with a commercial culture of *Streptococcus thermophilus*. Food Microbiol 28:1509–1513. doi: 10.1016/j.fm.2011.07.002

Mohareb F, Iriando M, Doulgeraki AI, et al (2015) Identification of meat spoilage gene biomarkers in *Pseudomonas putida* using gene profiling. Food Control 57:152–160. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.04.007

Munsch-Alatossava P, Alatossava T (2006) Phenotypic characterization of raw milk-associated psychrotrophic bacteria. Microbiol Res 161:334–346. doi: 10.1016/j.micres.2005.12.004

Notomi T (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res 28:63e–63. doi: 10.1093/nar/28.12.e63

Nyman A-KJ, Ågren ECC, Bergström K, Wahlström H (2013) Evaluation of the specificity of three enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies against *Salmonella* in bovine bulk milk. Acta Vet Scand 55:5. doi: 10.1186/1751-0147-55-5

Oliveira GB De, Favarin L, Luchese RH, McIntosh D (2015) Psychrotrophic bacteria in milk : How much do we really know ? Brazilian J Microbiol 321:313–321.

Olsen I (2015) Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. Eur. J. Clin.

Microbiol. Infect. Dis. 34:877–886.

Ortika BD, Habib M, Dunne EM, et al (2013) Production of latex agglutination reagents for pneumococcal serotyping. BMC Res Notes 6:49. doi: 10.1186/1756-0500-6-49

Parejko JA, Mavrodi D V, Mavrodi O V, et al (2012) Population Structure and Diversity of Phenazine-1-Carboxylic Acid Producing Fluorescent *Pseudomonas* spp. from Dryland Cereal Fields of Central Washington State (USA). Microb Ecol 64:226–241. doi: 10.1007/s00248-012-0015-0

Park HR, Hong MK, Hwang SY, et al (2014) Characterisation of *Pseudomonas aeruginosa* related to bovine mastitis. Acta Vet Hung 62:1–12. doi: 10.1556/AVet.2013.054

Peula-García JM, Molina-Bolivar J a, Velasco J, et al (2002) Interaction of bacterial endotoxine (lipopolysaccharide) with latex particles: application to latex agglutination immunoassays. J Colloid Interface Sci 245:230–6. doi: 10.1006/jcis.2001.7958

Pinto L, Ippolito A, Baruzzi F (2015) Control of spoiler *Pseudomonas* spp . on fresh cut vegetables by neutral electrolyzed water. Food Microbiol 50:102–108. doi: 10.1016/j.fm.2015.04.003

Poshtiban S, Singh A, Fitzpatrick G, Evoy S (2013) Bacteriophage tail-spike protein derivitized microresonator arrays for specific detection of pathogenic bacteria. Sensors Actuators, B Chem 181:410–416. doi: 10.1016/j.snb.2012.12.082

Puga CH, Orgaz B, SanJose C (2016) *Listeria monocytogenes* Impact on Mature or Old *Pseudomonas fluorescens* Biofilms During Growth at 4 and 20°C. Front Microbiol 7:1–9. doi: 10.3389/fmicb.2016.00134

Quibod IL, Grande G, Oreiro EG, et al (2015) Rice-infecting *Pseudomonas* genomes are highly accessorized and harbor multiple putative virulence mechanisms to Cause Sheath Brown Rot. PLoS One. doi: 10.1371/journal.pone.0139256

Rakhuba D V., Kolomiets EI, Szwajcer Dey E, Novik GI (2010) Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. Polish J Microbiol 59:145–155.

- Roach DR, Donovan DM (2015) Antimicrobial bacteriophage-derived proteins and therapeutic applications. *Bacteriophage* 5:e1062590. doi: 10.1080/21597081.2015.1062590
- Rombouts S, Volckaert A, Venneman S, et al (2016) Characterization of Novel Bacteriophages for Biocontrol of Bacterial Blight in Leek Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *porri*. *Front Microbiol* 7:279. doi: 10.3389/fmicb.2016.00279
- Samarajeewa AD, Glasauer SM, Dunfield KE (2010) Evaluation of petrifilm™ EC method for enumeration of *E. coli* from soil. *Lett Appl Microbiol* 50:457–461. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02819.x
- Savoia D (2014) New perspectives in the management of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Future Microbiol* 9:917–928. doi: 10.2217/fmb.14.42
- Scaccabarozzi L, Leoni L, Ballarini A, et al (2015) *Pseudomonas aeruginosa* in Dairy Goats: Genotypic and Phenotypic Comparison of Intramammary and Environmental Isolates. *PLoS One* 10:e0142973. doi: 10.1371/journal.pone.0142973
- Scales¹ BS, Dickson RP, Lipuma JJ, Huffnagle GB (2014) Microbiology, genomics, and clinical significance of the *Pseudomonas fluorescens* species complex, an unappreciated colonizer of humans. *Clin Microbiol Rev* 27:927–948. doi: 10.1128/CMR.00044-14
- Schmelcher M, Loessner MJ (2014a) Application of bacteriophages for detection of foodborne pathogens. *Bacteriophage* 4:e28137. doi: 10.4161/bact.28137
- Schmelcher M, Loessner MJ (2016) Bacteriophage endolysins: Applications for food safety. *Curr Opin Biotechnol* 37:76–87. doi: 10.1016/j.copbio.2015.10.005
- Singh A, Arya SK, Glass N, et al (2010) Bacteriophage tailspike proteins as molecular probes for sensitive and selective bacterial detection. *Biosens Bioelectron* 26:131–138. doi: 10.1016/j.bios.2010.05.024
- Slimani S, Robyns A, Jarraud S, et al (2012) Evaluation of propidium monoazide (PMA) treatment directly on membrane filter for the enumeration of viable but non cultivable *Legionella* by qPCR. *J Microbiol Methods* 88:319–321. doi: 10.1016/j.mimet.2011.12.010

Sokolov DM, Kashintsev I V, Sokolov MS (2011) [Petrifilm--up-to-date tests for microbiological control of food products, raw materials and environmental objects]. Vopr Pitan 80:34–8.

Spiers AJ, Buckling A, Rainey PB (2000) MINI REVIEW The causes of *Pseudomonas* diversity. Microbiology 146:2345–2350.

Tay L-L, Huang P-J, Tanha J, et al (2012) Silica encapsulated SERS nanoprobe conjugated to the bacteriophage tailspike protein for targeted detection of *Salmonella*. Chem Commun (Camb) 48:1024–6. doi: 10.1039/c1cc16325f

Tozzoli R, Grande L, Michelacci V, et al (2014) Identification and Characterization of a Peculiar vtx2-Converting Phage Frequently Present in Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* O157 Isolated from Human Infections. Infect Immun 82:3023–3032. doi: 10.1128/IAI.01836-14

Usher KM, Kaksonen AH, Cole I, Marney D (2014) Critical review: Microbially influenced corrosion of buried carbon steel pipes. Int. Biodeterior. Biodegrad. 93:84–106.

Uyar MF, Dikmen D, Kizil M, et al (2011) E.coli assessments of “Kasar cheese” via compact dry method at primary school canteens in Ankara, Turkey. J Pure Appl Microbiol 5:629–632.

Varga JJ, Barbier M, Mulet X, et al (2015) Genotypic and phenotypic analyses of a *Pseudomonas aeruginosa* chronic bronchiectasis isolate reveal differences from cystic fibrosis and laboratory strains. BMC Genomics 16:883. doi: 10.1186/s12864-015-2069-0

Venkatesan A, Spalding C, Speedie A, et al (2005) *Pseudomonas aeruginosa* infective endocarditis presenting as bacterial meningitis. doi: 10.1016/j.jinf.2005.02.019

Vinay M, Franche N, Grégori G, et al (2015) Phage-Based Fluorescent Biosensor Prototypes to Specifically Detect Enteric Bacteria Such as *E. coli* and *Salmonella enterica* Typhimurium. PLoS One 10:e0131466. doi: 10.1371/journal.pone.0131466

Vithanage NR, Yeager TR, Jadhav SR, et al (2014) International Journal of Food

Microbiology Comparison of identification systems for psychrotrophic bacteria isolated from raw bovine milk. *Int J Food Microbiol* 189:26–38. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.023

Welker CAD, Both JMC, Haas S, et al (2010) Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev Bras Biociências* 8:44–48.

Winsor GL, Lam DKW, Fleming L, et al (2011) *Pseudomonas* Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes. *Nucleic Acids Res* 39:D596–D600. doi: 10.1093/nar/gkq869

Winstanley C, Fothergill JL (2009) The role of quorum sensing in chronic cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* infections. *FEMS Microbiol Lett* 290:1–9. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01394.x

Wright E a., Di Lorenzo V, Trappetti C, et al (2015) Divergence of a strain of *Pseudomonas aeruginosa* during an outbreak of ovine mastitis. *Vet Microbiol* 175:105–113. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.11.011

Yang Q, Chen S, Ge B (2013) Detecting *Salmonella* serovars in shell eggs by loop-mediated isothermal amplification. *J Food Prot* 76:1790–6. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-13-140

Yang Q, Domesle KJ, Wang F, Ge B (2016) Rapid detection of *Salmonella* in food and feed by coupling loop-mediated isothermal amplification with bioluminescent assay in real-time. *BMC Microbiol* 16:112. doi: 10.1186/s12866-016-0730-7

Yousefi-avarvand A, Khashei R, Ebrahim-saraie HS, et al (2015) The Frequency of Exotoxin A and Exoenzymes S and U Genes Among Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Shiraz, Iran.

Zhang C, Bijl E, Hettinga K (2018) Destabilization of UHT milk by protease AprX from *Pseudomonas fluorescens* and plasmin. *Food Chem* 263:127–134. doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2018.04.128

Zhang H, Tian Y, Wan J, Zhao P (2015) Study of biofilm influenced corrosion on cast

iron pipes in reclaimed water. Appl Surf Sci 357:236–247. doi: 10.1016/j.apsusc.2015.09.021

Zhang W, Hu Y, Wang H, Sun L (2009) Identification and characterization of a virulence-associated protease from a pathogenic *Pseudomonas fluorescens* strain. Vet Microbiol 139:183–188. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.04.026

Zou X, Chen C, Huang X, et al (2016) Phage-free peptide ELISA for ochratoxin A detection based on biotinylated mimotope as a competing antigen. Talanta 146:394–400. doi: 10.1016/j.talanta.2015.08.049



CHAPTER 2

DETECTION OF *PSEUDOMONAS* USING UFV-P2 PHAGE TAIL FIBER PROTEIN BASED MICROAGGLUTINATION ASSAY

DETECTION OF *pseudomonas* BY MICROAGGLUTINATION BASED ON THE UFV-P2 PHAGE TAIL FIBER PROTEIN

CARVALHAIS, J.F.^{1,2}; LEAL, D.A.²; TREMBLAY, D.³; SALGADO, R.L.⁴; DIAS, R. S.⁵; de PAULA, S.O.⁵; MENDONÇA, R. S.²; MOINEAU, S.³; ELLER, M.R.^{1,2, *}.

¹Laboratory of Biochemical and Fermentative Processes/LAPROBQI.

²Department of Food Technology, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais – Brazil.

³Félix d'Hérelle Reference, Center for Bacterial Viruses. Department of Biochemistry, Microbiology and Bioinformatics, Faculty of Science and Engineering, Université Laval, Quebec – Canada.

⁴Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais – Brazil.

⁵Department of General Biology, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais – Brazil.

*Corresponding author: Monique Renon Eller – monique.eller@ufv.br / monique.eller@gmail.com - Phone: +55 31 3612-6800

ABSTRACT

Bacteria from the genus *Pseudomonas* plays an important role in milk, meat and fish spoilage because it can produce thermo-tolerant lipolytic and proteolytic enzymes, which reduce both the quality and shelf life of foods. Besides this, biofilm produced by these bacteria can in many cases facilitate the colonization of pathogenic microorganisms. The detection is the first step for the control and elimination of these bacteria; however, the traditional methods are time-consuming and complex. The objective of this work was to develop a rapid technique for the detection of *pseudomonas* in liquid solutions and in biofilms. For this, magnetic *beads* were affinity-linked to a structural phage protein that is responsible for recognition and binding to structures in the bacterial cell membrane. This complex formed by the *beads* and the structural phage protein, when in contact with the bacteria *P. fluorescens* and *P. aeruginosa* tend to form agglutinates visible to the naked eye. The test developed was able to detect *P. fluorescens* and *P. aeruginosa* and was negative to *P. putida*, *Lactococcus lactis*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia*

coli. The time to observe positive agglutination was 30 s and 3 min to *P. fluorescens* and *P. aeruginosa*, respectively and the lowest detectable concentration of *P. fluorescens* was 10^3 CFU·mL⁻¹ and 10^4 CFU·mL⁻¹ for *P. aeruginosa*. On *P. fluorescens* biofilms, the agglutination was observed in the first minute of contact, while *P. aeruginosa* biofilms were detected after 2 min. There was no difference in agglutination time in biofilms with 24 and 48 h of formation. However, mature biofilms (72 h) showed slower agglutination, presenting a time of agglutination between 4 to 5 min. The test was negative for *E. coli* biofilms. The tests using solution from swab presented agglutination after 3 min. The agglutination test was considered efficient and rapid to specifically detect *P. fluorescens* and *P. aeruginosa* in solutions or biofilms on stainless steel coupons. The development of technologies that allow the rapid detection of microorganisms is an important strategy for quality control in industries and safety of the population.

INTRODUCTION

Losses associated with contamination by microorganisms cause considerable impact to the food industry. Meat and dairy products are spoilage mainly by psychrotrophic microorganisms (Stellato et al. 2016, 2017; Lee et al. 2017) which have the capacity to grow under refrigerated conditions and produce thermally stable enzymes that destabilize macromolecules in these foods, leading to its premature degradation, with the formation of unpleasant flavors and loss of yield in the production of derivatives (Frohbieter et al. 2005; Andreani et al. 2016; Machado et al. 2017a; Meng et al. 2018; Zhang et al. 2018).

Bacteria from the *Pseudomonas* genus are important example of microorganisms that cause losses to the food industry by food spoilage because it is a psychrotrophic microorganism and present significant lipolytic and proteolytic activity (McPhee and Griffiths 2011; Oliveira et al. 2015).

Strategies to control food contamination and the consequent losses in the industry are primarily based on the identification of the microorganism and on the detection of contamination spots along the production chain (Rajkovic et al. 2010; Saccol et al. 2015; Carneiro and Kaneene 2017). For this, simple, agile and

economical technologies are essential. However, much of the existing techniques are costly and rely on procedures for enriching and incubating the samples, which can take many hours, or even days or are based on detection mechanisms that are not accessible to industry (Kaspar and Tartera 1990; Mitruka and Bonner 2017). Micro-agglutination tests present rapid results, with easy visualization, standardization and interpretation (Pennell et al. 1984; Hogan et al. 1988; Jafri et al. 2000; Idelevich et al. 2014).

The emerging strategy for the identification of microorganisms has been extensively evaluated is the phage proteins. This proteins can be highly specific and offer some advantages as it is not necessary the use of a viable phage (Hagens and Loessner 2014; Schmelcher and Loessner 2014b; Rees et al. 2015). Structural phage proteins are able to specifically recognize structures on the surface of their hosts and are stable to the conditions of food processing and storage, being potential molecules for use in detection systems (Berget and Poteete 1980; Bartual et al. 2010; Poshtiban et al. 2013; Golomidova et al. 2016; Tian et al. 2017). Tail protein is important to the phage to recognize its host. The phage UFV-P2 was able to recognize *P. fluorescens* and inhibit milk proteolysis in laboratory conditions.

This work describes the development of a specific and fast system for the detection of *P. fluorescens* and *P. aeruginosa* based on the tail fiber protein of this bacteriophage.

MATERIAL AND METHODS

Microorganisms and culture conditions

The phage UFV-P2 was isolated from the wastewater of a dairy industry in Brazil (Eller 2012) and had its genomic DNA sequenced and analyze Eller et al. (2013, 2014). Phage particles were propagated in the *P. fluorescens* 07A strain, isolated from refrigerated milk (Martins et al. 2005) and maintained at 30 °C in Luria Bertani medium.

Escherichia coli DH5α was used for plasmid replication and maintenance, while the recombinant protein was expressed by *E. coli* BL21. Both bacteria were cultivated using LB broth at 37 °C. The bacteria used for the specificity tests were *P. fluorescens* 07A, Martins et al. 2005, *P. fluorescens* ATCC 13523, *P. aeruginosa*

ATCC25619, *E. coli* CDC 0111AB, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 and *Lactococcus lactis* GLc05, obtained from LAMPOAH - Laboratory of Microbiology of Food and Waterborne Pathogens.

Sequencing and identification of viral proteins

The phage UFV-P2 was propagated adding 1 mL of the phage solution to 10 mL of a solution containing the bacteria *P. fluorescens* 07A in exponential phase of growth. Phage particles were purified with 10% PEG 8000 and the more abundant viral proteins were extracted from a 12% polyacrylamide denaturing gel (SDS-PAGE) and transferred to a Polyvinylidene Difluoride (PVDF) membrane at 200 V for 1.40 h. The membrane was stained (20 min) with 0.025% Coomassie Blue R-250 in 40% (v/v) methanol solution and revealed with a 50% (v/v) methanol solution. The bands were excised from the membrane and inserted into a Protein Sequencer PPSQ-31A /33A (Shimadzu Biotech) at the Nucleus of Biomolecules Analysis (NuBioMol) at UFV. The generated peptides were compared to sequences present in the Protein Data Bank (<http://www.wwpdb.org>) and specifically to putative proteins from the phage UFV-P2 genome (Berman et al. 2000). This step was performed to confirm the ORF65 (AFU 62926.1) as the one encoding the UFV-P2 phage tail fiber protein.

Cloning and expression of the UFV-P2 tail fiber protein

The nucleotide sequence of the ORF 65 encoding the UFV-P2 phage tail fiber protein was inserted into a plasmid pET23⁺ (GenOne, Brazil) with codon optimization aiming the expression by *E. coli* B21. The protein sequence was fused at the N-terminal to a *strep-tag* II tail. This tag is specific to Tactin, material covering the beads used in the test construction. A check mark was inserted to confer resistance to ampicillin. The restriction enzymes *Hind* III and *Nde* I were used for the transference. Transformation and cloning were performed as described by (Sambrook and W Russell 2001).

Protein expression

Selected *E. coli* BL21 colonies containing the expression plasmid were grown in LB medium to OD₆₀₀ 0.7. The expression was first optimized for the inducer

concentration by adding isopropyl beta-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) in concentrations of 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 and 1.0 mM at 16, 25, 30 or 37 °C during 12 and 24 h. Lactose was also tested as expression inducer at concentration of 370 mg/L at 37°C during 24 h. All tests were performed as independent triplicates.

For the extraction of the recombinant proteins, the samples were centrifuged at 15000 g for 15 min. The supernatants were discarded, and the pellets resuspended in 1 mL of W buffer (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) for each 100 mL of induction. The proteins whose expression was induced by IPTG were added of urea 4 M, while the proteins whose expression was induced by lactose were added of guanidine 3 M for the verification of possible insoluble forms of the protein.

Expression and extraction were analyzed by SDS-PAGE. Each combination of inducer concentration x incubation temperature was three times tested.

Protein quantification

Total protein was quantified using the method of Bradford (Bradford 1976) and also with Nanodrop (Thermo scientific, 2000/200c), using the molar extinction coefficient of 15595 calculated by the ProtParam software (ExPASy - SIB Bioinformatics Resource Portal).

Assembly of the detection system - coverage of magnetic *beads* with the phage tail proteins

The micro-agglutination test was performed as summarized in Figure 1. Magnetic *beads* were prepared as described by the manufacturer (Iba, manual, Version PR86-0004). To determine the best bead volume, 20, 50 and 100 µL from a 5% m/v stock *beads* suspension of *beads* respectively were tested. The *beads* suspension was equilibrated in 100 µL of buffer W and centrifuged for 15 min at 5000 g at room temperature. The supernatant was discarded, and the beads recovered by the addition of 500 µL of the protein solution. The *beads* added of the protein solution was cooled for 30 min on ice and vortexed every 5 min during the incubation. The samples were centrifuged again at 5000 g for 5 min. Unbound proteins were removed by washing the *beads* in 100 µL of buffer W (pH 7) and with subsequent

centrifugation. After the coating process, the *beads* coated with the tail fiber proteins were resuspended in 100 μL of buffer W and stored at 4°C until use.

The purification process was performed during the initial binding of the beads with the phage protein, this occurred spontaneously because the strep-tag II tail is highly specific to tactin present in the beads. This specific binding selects proteins and increases the efficiency of the test.

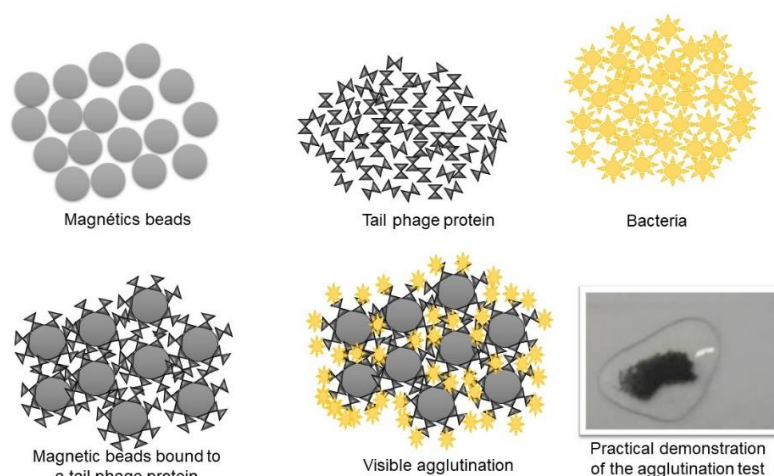


Figure 1. Demonstration of the micro-agglutination test

Evaluation of the sensitivity of the micro-agglutination test

Suspensions containing the 100 μL of the bacterium *P. fluorescens* 07A at 10^1 to 10^7 CFU·mL⁻¹ were added on glass slides containing suspensions of the *beads* covered with the protein (Figure 2).

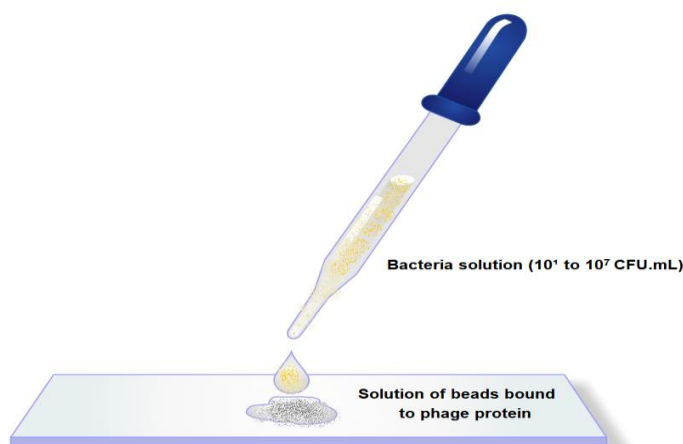


Figure 2. Sensitivity of the micro-agglutination test

The presence or absence of agglutination was observed at times 30 s, 1 min, 3 min and 5 min for each treatment and minimum reaction time was determined. The detection limit (LD) of the technique was determined by the lower concentration at which the presence of the contaminant can be distinguished at a 95% confidence level.

This experiment was performed three times, independently. The treatments were distributed in a completely randomized design in a factorial scheme, where all possible combinations among the different factors (*Pseudomonas* concentration and time), at each level, were analyzed. The means was analyzed by ANOVA at a 5% probability level.

EVALUATION OF THE SPECIFICITY OF THE MICRO-AGGLUTINATION TEST

The specificity of the test was evaluated using *P. fluorescens* 07A, *P. fluorescens* ATCC 13523, *P. aeruginosa* ATCC25619, *E. coli* CDC0111AB, *L. monocytogenes* ATCC15313 and *L. lactis* GLc05. The specificity test was conducted by adding 100 μ L of suspensions containing each bacterium to glass slides containing 100 μ L of coated-*beads* suspension. The positive result was indicated by the agglutination up to 5 h of contact.

DETECTION OF *Pseudomonads* BIOFILMS USING THE MICRO-AGGLUTINATION TEST

Stainless steel cards were immersed in an Erlenmeyer flask containing 60 mL of LB medium and *P. fluorescens* 07A at 10^5 CFU·mL⁻¹. The Erlenmeyer was incubated at 37 °C for 24, 48 or 72 h to allow biofilm formation on the surface of the cards, which were recovered and washed with PBS pH 7.4 to remove unbound cells. The formation of biofilms was confirmed by counting the number of cells adhered to the coupons. For this, the stainless-steel cards were immersed in an ultrasonic bath to release the cells and the solution was diluted and plated in LB medium.

Initially, the efficiency of the detection system was evaluated by directly pipetting 50 μ L from a suspension containing 5 μ L of the *beads* coated with the protein onto the surface of the stainless-steel cards containing the biofilm.

In a second experiment, *P. fluorescens* and *P. aeruginosa* biofilms were formed in stainless steel coupons for 72 h as previously described. The stainless-steel coupons were washed 3 times with PBS buffer. Commercial *swab* was used to remove cells from the biofilm surface passing three times on the surface of the coupons and then immersed in 1 mL of sterile saline solution. The system was agitated in vortex for 30 s and the resulting solution was used for the micro-agglutination test.

Both tests were performed in triplicate, and the results were considered as positive or negative for agglutination after 5 min of contact of the biofilms or bacterial suspensions with the coated-*beads* suspension.

RESULTS

Sequencing of the viral proteins

The sequencing of the viral proteins confirmed the predicted sequence of the ORF 65 in the UFV-P2 genome. This sequence was successfully inserted into a pET 23a+ plasmid and cloned in *E. coli* DH5 α .

Protein expression and quantification

Expression of the viral protein in *E. coli* BL21 was maximum at both 16 and 37 °C and 0.3 mM of IPTG, producing on average 1,5 mg·mL⁻¹ of protein (Figure 1). The expression induced by lactose generated 1,35 mg·mL⁻¹ of total protein. In both cases the protein was partitioned in the inclusion body. The addition of 4 M urea or 3 M of guanidine was required to solubilize the expressed protein.

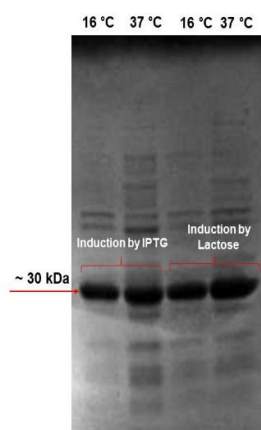


Figure 3. Protein expression with 0.3 mM IPTG using urea 4M for extraction and protein expression with lactose using guanidine 3M for extraction at 16 °C and 37 °C.

Standardization of the agglutination test

Tests performed using volumes 20 and 50 μL of the 5 % bead suspension were inconclusive or negative for agglutination, independently of the bacterial concentration. The ideal volume for the test was 100 μL of the *beads* suspension. False negative results were also found when concentrations lower than 50 ng of protein extract were bound to the *beads*.

Specificity test

Agglutination was observed when the species *P. fluorescens* (both strains) and *P. aeruginosa* were present in the glass, as cultivated suspensions, as biofilms or even as solutions from the swab. None agglutination was observed in the presence of suspensions containing 10^8 CFU.mL⁻¹ of *P. putida*, *L. lactis*, *L. monocytogenes* and *E. coli*, or in *E. coli* biofilms.

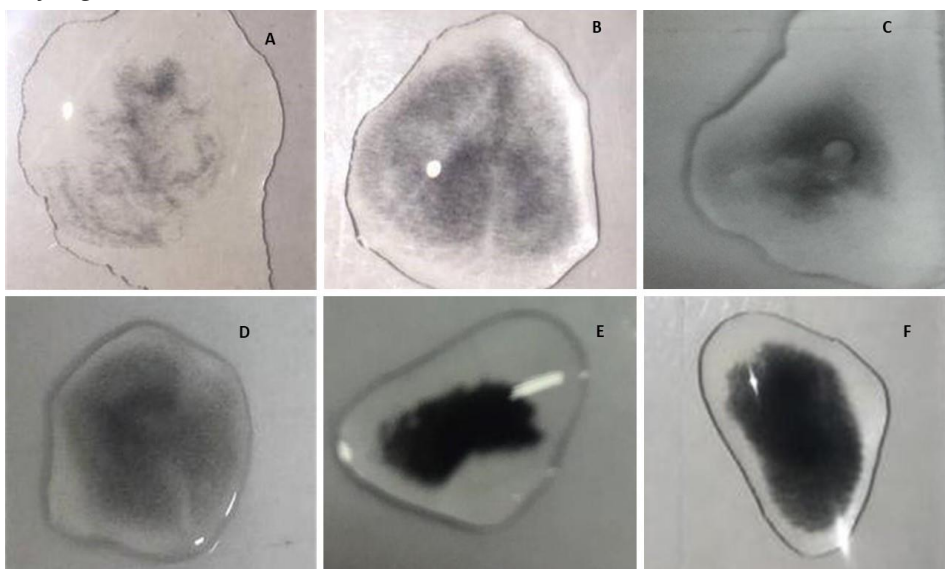


Figure 4. A: Microagglutination test using magnetic *beads* coated with the UFV-P2 tail fiber protein in the presence A: *P. aeruginosa*; B2: *P. fluorescens*; C3: *Pseudomonas putida*; D4: *Lactococcus lactis*; E5: *Listeria monocytogenes*; F6: *Escherichia coli* after 1 min of contact.

Time of the result

The agglutination was considered negative when none agglutination was formed after 5 min of contact between the suspensions containing the coated *beads* and bacteria (Fig. 2B). This result was confirmed after a period of 5 h.

When the specie *P. fluorescens* was present in nutrient broth, at concentrations between 10^5 to 10^7 CFU.mL⁻¹, agglutination occurred in the first 30 s

of contact (Fig. 2B). Concentrations between 10^4 to 10^3 CFU·mL⁻¹ has lead to agglutination after approximately 1 min.

The agglutination was slower in the presence of *P. aeruginosa* at 10^4 to 10^7 CFU·mL⁻¹, with visible agglutination after 2 min of contact (Fig.2C).

Solutions from swab generated agglutination only after 3 min of contact. Biofilms of *P. fluorescens* and *P. aeruginosa* also presented agglutination (Fig.2D), confirming the potential of the test to specifically identify these species in a variety of environments. Biofilms with 24 and 48 h presented agglutination in the first minute of contact for *P. fluorescens*, and after 2 min for *P. aeruginosa*. Biofilms with 72 h presented slower agglutination, after 4 and 5 min, respectively. There was no formation of agglutinates in *E. coli* biofilms.

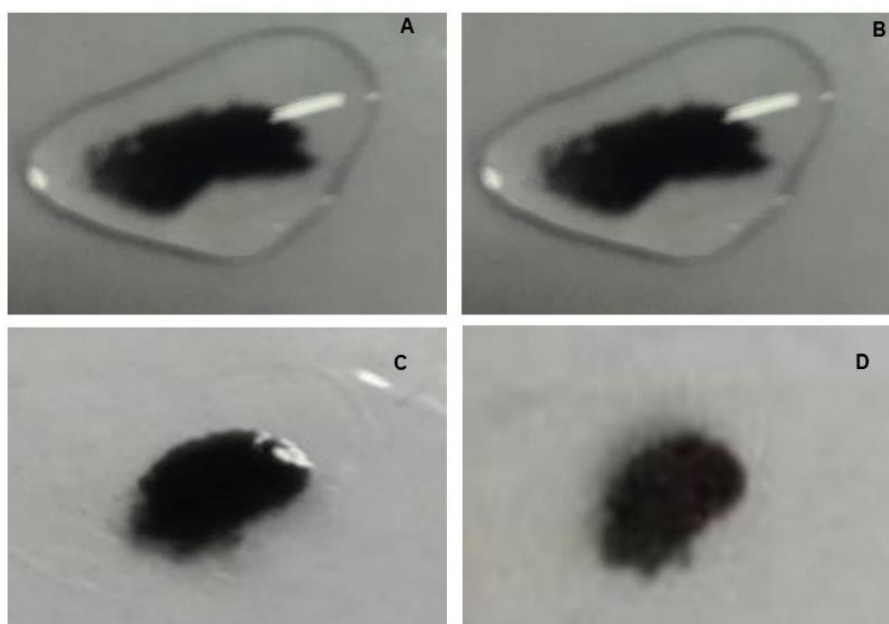


Figure 5. Evaluation of agglutination test with *P. fluorescens* suspensions during the time. A: 30 s; B: 1 min; C: 3 min; and D: 5 min of contact between the bacteria and suspensions containing covered beads with tail fiber protein.

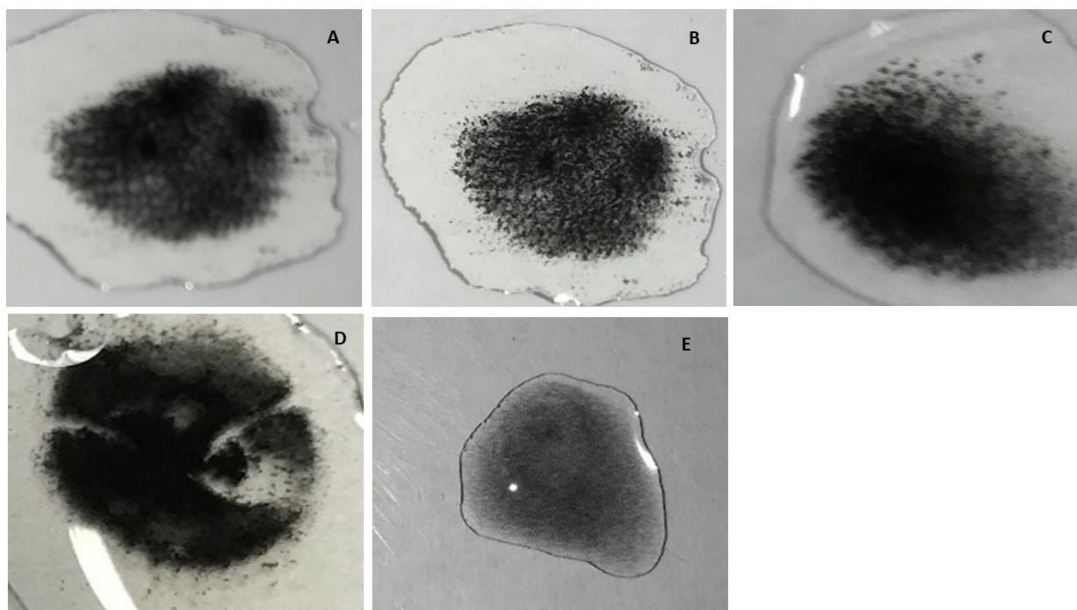


Figure 6. Evaluation of agglutination test with *P. aeruginosa* suspensions during the time: A: 2 min ; B: 3 min; C: 4 min; D: 5 min. E: Control after 5 min.

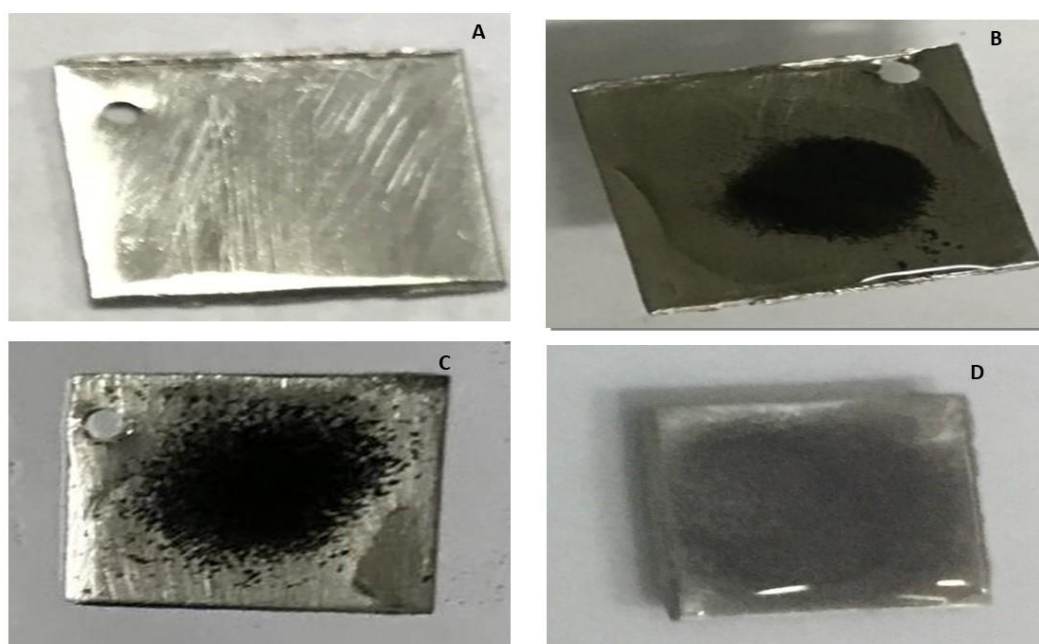


Figure 7. Evaluation of agglutination test in biofilms of A: Stainless steel coupon; B: *Pseudomonas aeruginosa*; C: and D: *Escherichia coli* (negative control).

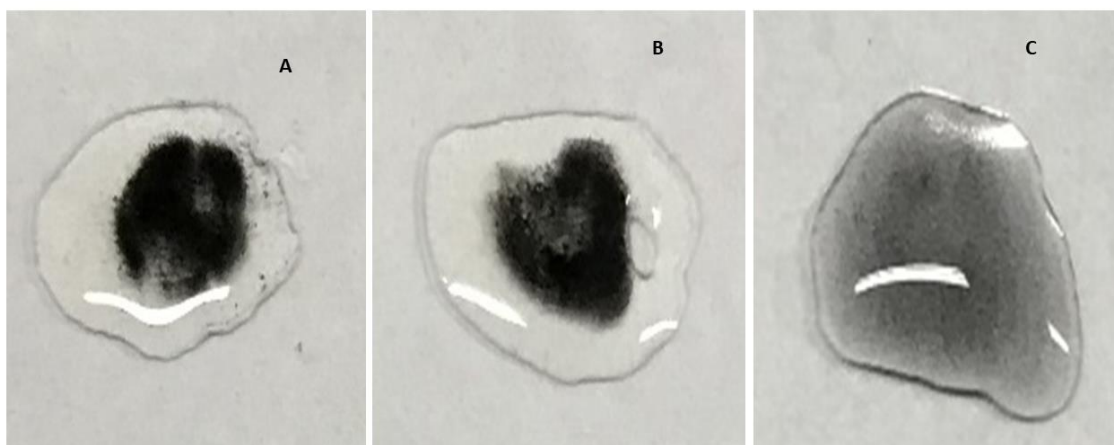


Figure 8. Evaluation of agglutination test suspensions from swab. A: *P. aeruginosa*; B: *Pseudomonas aeruginosa*; C: *Escherichia coli* (negative control).

Sensitivity tests

The lowest detectable concentration of *P. fluorescens* 07A in suspension was 10^3 CFU.mL⁻¹ and 10^4 CFU.mL⁻¹ for *P. aeruginosa*.

DISCUSSION

The expression of the protein was efficient using the two expression inducers tested, IPTG and Lactose. The use of lactose might provide an alternative means of inducing protein expression because it is cheap and more attractive in industrial scale productions of recombinant proteins (Wurm et al. 2016; Hausjell et al. 2018).

In general, the phages tail fiber proteins are responsible for attachment to the host cell. The UFV-P2 tail fiber protein was expressed fused to a strep-tag II that was affinity-linked to magnetic *beads*. The bead-protein binding was based on the highly and selective affinity between *strep-tag II* and *strep-tactin* present in the surface of the *beads* (Schmidt et al. 2013; Johar and Talbert 2017).

The specific coverage of the *beads* with the viral protein was confirmed by the result of positive agglutination when in contact with the bacteria *P. fluorescens* and *P. aeruginosa*. Among the all bacterial strains tested, it was observed that the test had positive response for strains belonging to the genus *Pseudomonas*. This may be justified by the fact that the phage protein used in the test constitution is from a phage specificity for *P. fluorescens* (Eller et al. 2013).

The biofilm agglutination test was efficient and considered fast. The biofilm with 72 h of formation showed slower agglutination than the other times. This behavior can be justified in hypothesis, by the accumulation of exopolysaccharides

produced by the cells during the formation of the biofilm (Read and Costerton 2010; Carrascosa et al. 2015; Maunders and Welch 2017). The exopolysaccharides produced may make it difficult to access the test solution to the cells and, in the end, delay the agglutination process.

The efficiency of the test developed to identify *P. fluorescens* and *P. aeruginosa* in solution and in biofilms can bring the industries a tool that allows the rapid detection of these contaminants being possible to avoid losses of quality, economic losses and even damages to the health of the consumer. In addition, the use of the test allows the reduction of the time to verify the points of cross contamination in the industry reducing the risks associated with contaminants.

Diseases caused by ingestion of food contaminated by pathogens continue to be a worldwide concern as they still cause serious health problems and can lead to death (Todd et al. 2010; Alum et al. 2016). Limiting and controlling food-borne outbreaks has been a major challenge for food researchers (Wu et al. 2015; Møller et al. 2018). The detection of pathogenic bacteria still represents not only a scientific challenge, but also a practical problem of great importance for industries and consumers (Wei and Li 2013; Baraketi et al. 2018; Rajapaksha et al. 2019).

Conventional techniques of culture and identification, as well as molecular methods based on PCR amplification and immunological assays, are now the main tools used to identify and quantify pathogenic microorganisms. These traditionally used techniques are mostly sensitive, however, most of these approaches are still time-consuming, costly and need trained personnel to conduct these analyzes (Gehring et al. 2004; Delgado-viscogliosi et al. 2009; Paolucci et al. 2010; Chiou et al. 2015).

P. fluorescens and *P. aeruginosa* are described as species responsible for the development of biofilms on different surfaces of equipment and utensils, which allows the establishment of other potentially dangerous microorganisms, such as *Staphylococcus* sp., *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* sp. (Wirtanen and Mattila-Sandholm 1992; Adetunji et al. 2014; Culotti and Packman 2014; Fernanda et al. 2015; Fatemi and Frank 2016; de Grandi et al. 2018). The greater efficiency in the detection of these bacteria is an important factor for increasing the competitiveness of the industry by reducing the time and cost of the microorganism

identification tests, which would also allow the maintenance of a routine control of these contaminants (Srianta et al. 2009; Lopez et al. 2018).

The use of phages for the detection of microorganisms already has numerous reports in the literature, since they present several advantages such as high robustness, rapidity and high sensitivity (Mosier-Boss et al. 2003; Schmelcher and Loessner 2008; Santos et al. 2009; Smartt et al. 2012; McKinstry and Edgar 2014; Manohar et al. 2018; Costa et al. 2019; Hyman 2019). These types of assays detect only active and viable cells. It is noteworthy that using phages reporters requires detailed genetic knowledge of the phage, in addition the phages reporters create genetically modified organisms (GMOs) infecting their host cells represents with respect to consumer acceptance and regulatory approval of the reporter phage products. Consequently, despite the large number of studies proving the efficiency of this type of test, there is still no commercially available product based on this technology in Brazil.

Interest in the use of phage proteins has been increasing exponentially, since it is a fast alternative with specific response and does not vary its efficiency due to mutations of the host (Menéndez et al. 2011; Criscuolo et al. 2017). The use of the UFV-P2 phage tail protein for composition of a detection system has demonstrated by this experiment an efficient tool for the detection of *P. fluorescens* and *P. aeruginosa* in aqueous solution and in mature biofilms.

CONCLUSION

The use of the UFV-P2 phage syrup protein for composition of a detection system is as demonstrated by this experiment an efficient tool for the detection of *P. fluorescens* and *P. aeruginosa* in aqueous solution and in mature biofilms.

There is currently no adequate solution that allows the selective and sensitive binding to a specific microorganism, which is rapid in detection and tracking, of inexpensive implementation and what makes the developed technology an innovation for the market.

REFERENCES

Alum, Akanele, E., Chukwu, S. & Ahudie, C. Microbiological Contamination Of Food:

The Mechanisms, Impacts And Prevention. *Int. J. Sci. Technol. Res.* **5**, 65–78 (2016).

Andreani, N. A. *et al.* Characterisation of the thermostable protease AprX in strains of *Pseudomonas fluorescens* and impact on the shelf-life of dairy products: preliminary results. *Ital. J. Food Saf.* **5**, 239–244 (2016).

Bartual, S. G. *et al.* Structure of the bacteriophage T4 long tail fiber receptor-binding tip. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 20287–20292 (2010).

Berget, P. B. & Poteete, A. R. Structure and functions of the bacteriophage P22 tail protein. *J. Virol.* **34**, 234–43 (1980).

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).

Carneiro, P. & Kaneene, J. B. Food inspection services: A comparison of programs in the US and Brazil. *Food Control* **80**, 314–318 (2017).

Carrascosa, C. *et al.* Blue pigment in fresh cheese produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Food Control* **54**, 95–102 (2015).

Chaudhry, W. N. *et al.* Synergy and order effects of antibiotics and phages in killing *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS One* **12**, 1–16 (2017).

Eller, M. R. *et al.* Complete Genome Sequence of the *Pseudomonas fluorescens* Bacteriophage UFV-P2. *Genome Announc.* **1**, (2013).

Eller, M. R. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* - specific phage and its use to control milk proteolysis. Dissertation thesis presented to the Universidade Federal de Viçosa as part of the requirements of the PostGraduate Program in Agr. (2012).

Frohbieter, K. A., Ismail, B., Nielsen, S. S. & Hayes, K. D. Effects of *Pseudomonas fluorescens* M3 / 6 Bacterial Protease on Plasmin System and Plasminogen Activation. *J. Dairy Sci.* **88**, 3392–3401 (2005).

Golomidova, A. *et al.* Branched Lateral Tail Fiber Organization in T5-Like

Bacteriophages DT57C and DT571/2 is Revealed by Genetic and Functional Analysis. *Viruses* **8**, 26 (2016).

Hagens, S. & Loessner, M. J. Phages of *Listeria* offer novel tools for diagnostics and biocontrol. *Front. Microbiol.* **5**, 1–6 (2014).

Hogan, J. S., Smith, K. L., Todhunter, D. A. & Schoenberger, P. S. Sensitivity and specificity of latex agglutination tests used to identify *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* isolated from bulk tank milk. *Am. J. Vet. Res.* **49**, 1537–1539 (1988).

Idelevich, E. A. *et al.* Bacteriophage-based latex agglutination test for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 3394–3398 (2014).

Jafri, A. K., Reisner, B. S. & Woods, G. L. Evaluation of a latex agglutination assay for rapid detection of oxacillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **36**, 57–59 (2000).

Johar, S. S. & Talbert, J. N. Strep-tag II fusion technology for the modification and immobilization of lipase B from *Candida antarctica* (CALB). *J. Genet. Eng. Biotechnol.* **15**, 359–367 (2017).

Kaspar, C. W. & Tartera, C. Methods for Detecting Microbial Pathogens in Food and Water. *Methods Microbiol.* **22**, 497–531 (1990).

Lazcka, O., Campo, F. J. Del & Muñoz, F. X. Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* **22**, 1205–1217 (2007).

Lee, H. S., Kwon, M., Heo, S., Kim, M. G. & Kim, G. Characterization of the Biodiversity of the Spoilage Microbiota in Chicken Meat Using Next Generation Sequencing and Culture Dependent Approach. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* **37**, 535–541 (2017).

Machado, S. G. *et al.* The biodiversity of the microbiota producing heat-resistant enzymes responsible for spoilage in processed bovine milk and dairy products. *Front. Microbiol.* **8**, 1–22 (2017).

Martins, M. L., De Araújo, E. F., Mantovani, H. C., Moraes, C. A. & Vanetti, M. C. D. Detection of the apr gene in proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. *Int. J. Food Microbiol.* **102**, 203–211 (2005).

Maslov, S. & Sneppen, K. Well-temperate phage: Optimal bet-hedging against local environmental collapses. *Sci. Rep.* **5**, 1–11 (2015).

Maunder, E. & Welch, M. Matrix exopolysaccharides; the sticky side of biofilm formation. *FEMS Microbiol. Lett.* **364**, (2017).

McPhee, J. D. & Griffiths, M. W. Psychrotrophic Bacteria | *Pseudomonas* spp. *Encycl. Dairy Sci.* 379–383 (2011). doi:10.1016/B978-0-12-374407-4.00441-6

Meng, L. *et al.* Identification and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different raw milks at storage temperatures. *J. Dairy Sci.* **101**, 2897–2905 (2018).

Mitruka, B. M. & Bonner, M. J. *Methods of detection and identification of bacteria. Methods of Detection and Identification of Bacteria* (2017). doi:10.1201/9780203711347

Oliveira, G. B. De, Favarin, L., Luchese, R. H. & McIntosh, D. Psychrotrophic bacteria in milk : How much do we really know ? *Brazilian J. Microbiol.* **321**, 313–321 (2015).

Pennell, D. R., Rott-Petri, J. A. & Kurzynski, T. A. Evaluation of three commercial agglutination tests for the identification of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **20**, 614–617 (1984).

Poshtiban, S., Singh, A., Fitzpatrick, G. & Evoy, S. Bacteriophage tail-spike protein derivitized microresonator arrays for specific detection of pathogenic bacteria. *Sensors Actuators, B Chem.* **181**, 410–416 (2013).

Rajkovic, A., Smigic, N. & Devlieghere, F. Contemporary strategies in combating microbial contamination in food chain. *Int. J. Food Microbiol.* **141**, S29–S42 (2010).

Read, R. R. & Costerton, J. W. Purification and characterization of adhesive exopolysaccharides from *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* .

Can. J. Microbiol. **33**, 1080–1090 (2010).

Rees, C. E. D., Green, L. H., Goldman, E. & Loessner, M. J. in *Practical Handbook of Microbiology, Third Edition* 99–114 (2015). doi:10.1201/b17871

Saccol, A. L. F. *et al.* Sanitary legislation governing Food Services in Brazil. *Food Control* **52**, 27–33 (2015).

Sambrook, J. & W Russell, D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harb. Lab. Press. Cold Spring Harb. NY* 999 (2001).

Schmelcher, M. & Loessner, M. J. Application of bacteriophages for detection of foodborne pathogens. *Bacteriophage* **4**, e28137 (2014).

Schmidt, T. G. M. *et al.* Development of the Twin-Strep-tag® and its application for purification of recombinant proteins from cell culture supernatants. *Protein Expression and Purification* **92**, 54–61 (2013).

Stellato, G. *et al.* Overlap of Spoilage-Associated Microbiota between Meat and the Meat Processing Environment in Small-Scale and Large-Scale Retail. *July 2016 Vol. 82 Number 13 Appl. Environ. Microbiol.* **82**, 4045–4054 (2016).

Stellato, G., Utter, D. R., Voorhis, A., Angelis, M. De & Eren, A. M. A Few *Pseudomonas* Oligotypes Dominate in the Meat and Dairy Processing Environment. *Front. Microbiol.* **8**, 1–9 (2017).

Tian, Y. *et al.* Grass carp reovirus-GD108 fiber protein is involved in cell attachment. *Virus Genes* **53**, 613–622 (2017).

Todd, E. C. D., Michaels, B. S., Greig, J. D., Smith, D. & Bartleson, C. A. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 8. Gloves as barriers to prevent contamination of food by workers. *J. Food Prot.* **73**, 1762–73 (2010).

Zhang, C., Bijl, E. & Hettinga, K. Destabilization of UHT milk by protease AprX from *Pseudomonas fluorescens* and plasmin. *Food Chem.* **263**, 127–134 (2018).

CHAPTER 3.

CONTROLLING PSEUDOMONADS BIOFILM FORMATION USING PHAGE P10 UNDER DYNAMIC AND STATIC CONDITIONS

CONTROLLING PSEUDOMONAD BIOFILM FORMATION USING PHAGE P10 UNDER DYNAMIC AND STATIC CONDITION

Jéssica F. Carvalhais*; Denise Tremblay**; Sylvain Moineau**; Monique R. Eller*

*Department of Food Technology, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais – Brazil.

** Department of Biochemistry, Microbiology and Bioinformatics, Faculty of Science and Engineering, Université Laval, Quebec – Canada.

*Corresponding author: Monique Renon Eller – monique.eller@ufv.br / monique.eller@gmail.com - Phone: +55 31 3612-6800

Abstract

The elimination of the *Pseudomonas fluorescens* biofilm represents a great challenge for the food industry. The use of phages to control biofilm formation is a good alternative for food industries because it is inexpensive, easy to manipulate and safe. The objective of this study was to evaluate the effects of adding phage P10 during *P. fluorescens* biofilm formation. The effects of P10 on pre-formed biofilm on polystyrene plates after 6 h of contact and over the course of 48 h were also examined. In both cases the phage activity was evaluated under static and dynamic condition at room temperature. The titers of the bacteria and phage were 10^5 CFU·mL⁻¹ and 10^8 PFU·mL⁻¹, respectively. Phage P10 significantly reduced ($p<0.05$) the number of adhered cells during the biofilm formation and in pre-formed biofilm under static and dynamic condition. The phage activity was more effective in younger biofilms. Adding phages during the biofilm formation resulted in an average 2.5-log reduction in the number of adhered cells. When the phages were added to pre-formed biofilm at 12 h, there was a 1.2 log reduction in the number of adhered cells. The use of phage P10 for these purposes is becoming increasingly relevant in terms of pathogenic bacterial resistance to the sanitizers that are traditionally used in food industries. Using the P10 phage to control biofilm formation may be a promising alternative for use in the food industry.

Key words: *Pseudomonas fluorescens*, biofilm, polystyrene plates, biotechnology.

INTRODUCTION

Pseudomonas fluorescens is a psychrotrophic bacterium that can inhabit many environments including soil, water, plants and animals. An important characteristic of this species is its capacity to grow and colonize on mammalian hosts (Vithanage et al. 2014; Xu et al. 2017). These bacteria have been studied over the years mainly because they play a role in food spoilage. For example, they are responsible for the deterioration of milk, meat and fish (Parejko et al. 2012; Gardiner et al. 2013; Martins et al. 2015). When this bacterium contaminates milk and milk products, it secretes hydrolytic enzymes, especially lipases and proteases. The presence of these thermo-tolerant enzymes reduces the quality and shelf life of refrigerated food (Vithanage et al. 2014; Matéos et al. 2015; Xin et al. 2017).

Moreover, used as a survival mechanism, these bacteria can adhere to surfaces due to their ability to synthesize proteins capable of interacting with abiotic surface forming biofilms (O'Toole and Kolter 1998; Caixeta et al. 2012). Physical and chemical factors as well as internal and external factors can affect the adhesive strength of biofilms formed by *P. fluorescens*. These factors include the concentrations of the nutrients present, pH, surface roughness, and flow velocity. The flow velocity can increase biofilm formation and make it more compact and, consequently, harder to eliminate (Dourou et al. 2011; Karimi et al. 2015).

When these bacteria are organized into a biofilm, they are less susceptible to the actions of antimicrobial agents (Kokare et al. 2009). A compounding factor is that the formation of *P. fluorescens* biofilm facilitates the adhesion of other pathogenic bacteria like *Listeria*, *Salmonella* and *Staphylococcus*. The wide diversity of microorganisms that are present in biofilms increases their resistance and the chances of cross-contamination (Kostaki et al. 2012; Giaouris et al. 2013; Makovcova et al. 2017; Galié et al. 2018).

The removal of bacterial biofilms represents a challenge for the food industry since it can lower the efficiency of heating equipment through fouling in pipelines, and by increasing the fluid frictional resistance and the corrosion rate of surfaces. In many cases, it can lead to the disposal of products due to cross-contamination and post-processing contamination (Garrett et al. 2008; Fagerlund et al. 2017). Currently, the main strategy for combatting the formation of biofilms is by using physical or

chemical sanitizers. Unfortunately, the bacterium has the capacity to develop resistance mechanisms, making the removal of mature biofilms laborious (Kostaki et al. 2012; Giaouris et al. 2013; Galié et al. 2018).

The method of using phages to control spoilage and pathogenic microorganisms is a natural, non-toxic, and highly specific technique. In the food industry, the potential of using phages as sanitizing agents in the control of biofilms has been evaluated, mostly because they can produce depolymerizing enzymes that degrade the extracellular polymeric substances (EPS) (Gutiérrez et al. 2016). The objective of this work is to evaluate the ability of P10 phages to prevent the formation of and control the growth of *P. fluorescens* biofilms.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and materials

The phages used in this work came from the Centre de référence pour les virus bactériens Félix d'Hérelle, Quebec, Canada and were isolated from Pasig river, Manila, Philippines. This phage belongs to the *Podoviridae* family whose members are characterized as having long, flexible and beaded tail fibers. This study used the strain *P. fluorescens* 1444 and phage P10. It was cultivated in 0.5 X Luria-Bertani broth at room temperature. In all the experiments the *P. fluorescens* titer was 10^5 CFU·mL⁻¹ and the P10 phage titer was 10^8 PFU·mL⁻¹.

Growth curve for *P. fluorescens* in the presence of P10 phages

The lytic activity of the P10 phages was observed by monitoring the optical density (OD) and phage concentration for 6 h at 180 rpm at room temperature. To accomplish this, 100 µL of culture was incubated overnight and then was added to 10 mL of 0.5X Luria-Bertani broth followed by the addition of the P10 phages. The OD and phage concentration were evaluated every 30 min. Phage concentration was calculated using spot tests (Champagne and Gardner 1995). The titer was calculated after overnight incubation at room temperature.

P10 phage adsorption test

A volume of 10 mL of LB was inoculated with an aliquot of 2% (v/v) of *P. fluorescens* 1444 and allowed to grow until OD₆₀₀ = 0.6 to 0.8. This solution was mixed with suspension containing the phages (10^5 PFU·mL⁻¹) and it was incubated at

room temperature for 30 min. Every 30 min, a sample of one mL was collected and centrifuged (12 000 *g* for 1 min). Free phages in the supernatant were counted using spot tests and the results were expressed as percentages. Adsorption curves were generated by adding phages to samples with fixed bacteria concentrations, at specific time intervals. Phage adsorption was calculated as follows: percentage adsorption = ((control titre – residual titer) / control titer) × 100 (Czajkowski et al. 2015).

Actuation of the P10 phage over biofilm formation

Biofilm formation in the presence of P10 phages

Biofilm formation was done in 96-well polystyrene plates. A combination of 200 µL of *P. fluorescens* (10⁹ CFU·mL⁻¹) and 200 µL of P10 phages (10⁸ PFU·mL⁻¹) were added to the wells at the same time and incubated for 48 h. After 6, 12, 24 and 48 h, the number of adhered cells was evaluated. The renewed every 12 h. The plates were incubated at a constant speed of 180 rpm, representing dynamic conditions and under static conditions (no shaking). The negative control consisted of the addition of *P. fluorescens* (without phages) under the same conditions as the other treatments.

Evaluation of phage P10 activity on pre-formed biofilms

Biofilms were pre-formed during 6, 12, 24 and 48 h. After each of these time periods 200 µL of the P10 phage suspension (10⁸ PFU·mL⁻¹) was added to and maintained contact during 6 h. with the pre-formed After this time, the number of aggregated cells were evaluated. The medium was refreshed every 12 h. The plates were incubated at a constant speed of 180 rpm, representing dynamic conditions, and under static conditions (no shaking). The negative control consisted of the addition of *P. fluorescens* (without phages) under the same conditions as the other treatments.

Adhered cell counts

The microplate wells were washed three times with saline solution to remove the cells that did not adhere to the plate. Then to enumerate the adhered cells, 200 µL of fresh saline solution was added to each well and the biofilm was scraped with a spatula. This samples were diluted in saline solution and one drop (10 µL) was placed

into plate with LB agar. The plates were incubated at room temperature for 16 to 18h.

Statistical analysis

The statistical analyses were performed using the SAS® statistical package (version 9.3, SAS Institute Incorporation, USA; licensed by Universidade Federal de Viçosa). The means were compared using an analysis of variance (ANOVA) with 95% confidence.

RESULTS

Determining phage P10 efficiency against *P. fluorescens* 1444

Bacterial growth was clearly affected by the presence of P10 phages (Figure 1). After 4.5 and 5.5 h, the *P. fluorescens* counts showed approximately 4 and 6 log reductions compared to the control, respectively. The absorbance was also affected by phage *P. Fluorescens* interaction, leading to a reduction over the course of 6 h (Figure 1). There was a significant decrease in phage count in the first 30 min, which may indicate that during this period, the phages were adsorbed to the cell membrane (Figure 1).

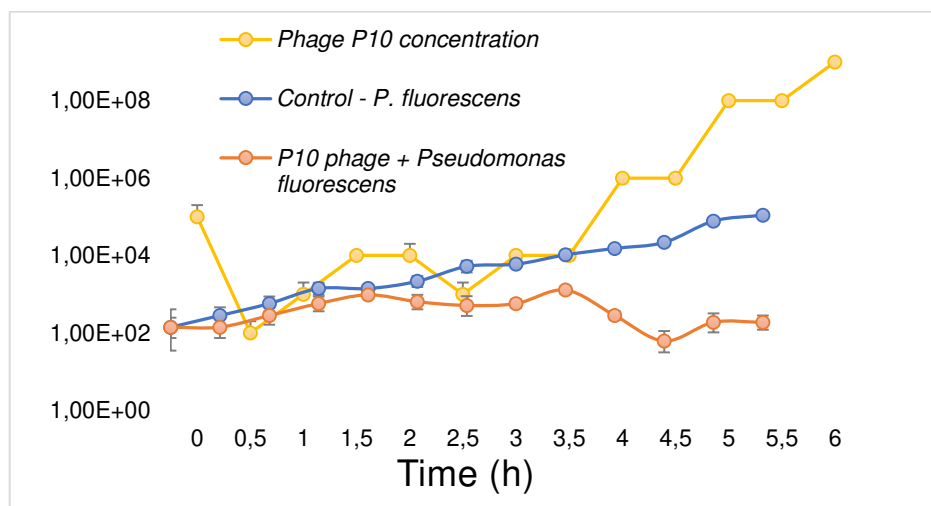


Figure 1. Evaluation of *P. fluorescens* 1444 growth behavior in the presence of P10 phage and the oscillation of phage concentration during in LB nutrient broth.

The oscillations in phage concentration were evidenced during the experiment. The adsorption was measured over the evaluated time, reaching 89% adsorption after 30 min (Figure 2). A graph of the adsorption test exhibited two phases. The first phase began after 5 min of contact between the phages and the bacteria, in this

period 30% of the phage population had adsorbed to the cell membrane. The second phase occurred after 15 min when more than 70% of the phages were adsorbed.

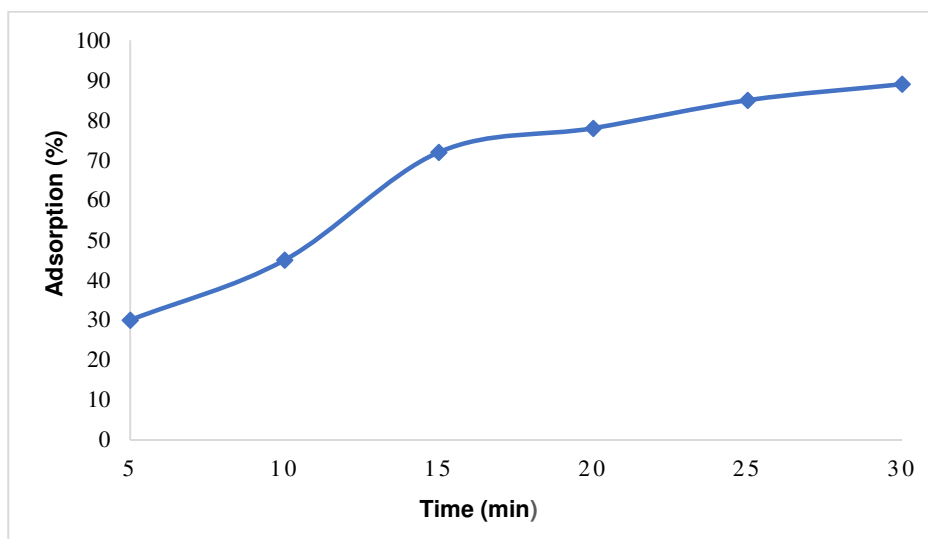


Figure 2. Phage P10 adsorption in *P. fluorescens* 1444 over 30 min.

Determining phage P10 efficiency during *P. fluorescens* biofilm formation

It was not possible to count cells that attached to the plate walls until 6 h, suggesting that there was no biofilm formation before this time. Biofilm formation was only observed from 12 h onward (Figures 3 and 4). Under static conditions, the number of adhered cells grew gradually throughout the observed time and was significantly different at all the analyzed time points. Most cell adhesion occurs before between 12 and 24 h. The number of adhered cells at 48 h was higher under static conditions than biofilms incubated under dynamic conditions over the same time period (Figure 3).

The presence of the P10 phages affected the number of adhered cells for all the times analyzed under static and dynamic condition (Figure 3). Phage activity was more efficient in younger biofilms, since at 12h reduction occurred in the number of adhered cells the 2.5 and 2.0 logs under dynamic and static conditions, respectively. The phage activity was less efficient after 48 h of biofilm formation, but still affected of the number of adhered cells, resulting in a ~1 log reduction under dynamic and static conditions (Figure 3).

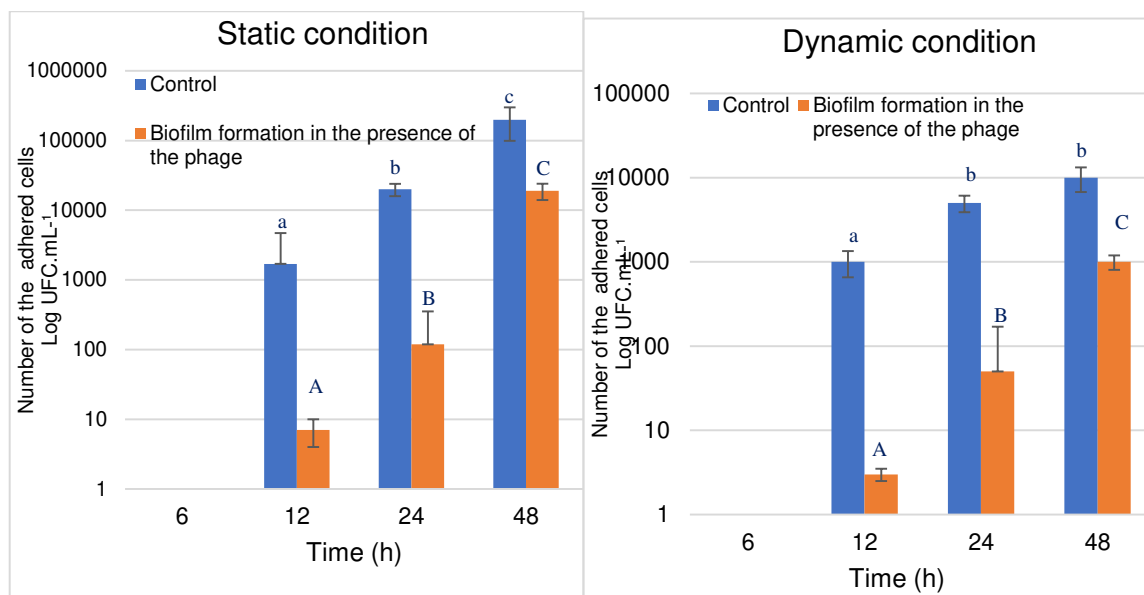


Figure 3. Number of the adhered cells at different times during biofilm formation when treated with phages. Cells were counted under static and dynamic conditions. Error bars indicate standard deviation. The same letters indicate values that are not significantly different from each other (capital letters and lowercase letters represent significant differences between them).

Determining phage P10 efficiency in pre-formed biofilms of *P. fluorescens*

The numbers of cells that adhered to the plate walls under dynamic and static conditions were different at each time point that was analyzed. The numbers exhibited a progressive increase through time (Figure 4). There was no significant difference in the number of adhered cells at 24 and 48 h for pre-formed biofilm under dynamic conditions (Figure 4).

Compared with the control, the numbers of adhered cells that were counted after exposure to phage P10 were lower at each time point and under dynamic and static conditions (Figure 4). However, the phage activity was most significant at 12h for pre-formed biofilm under dynamic conditions. No other significant differences in adhered cell numbers were observed between static and dynamic conditions at any other time points.

Adding P10 phages to pre-formed biofilm was less efficient for reducing the number of adhered cells than adding phages during biofilm formation in the first 24 h under dynamic and static condition. However, under static conditions at 48 h, there was no significant difference between counts when phages were added at the early stages of biofilm formation or when added to pre-formed biofilm. Under dynamic

conditions at 48h, P10 phages were more effective at reducing adhered cells when added to the pre-formed biofilm compared to when phages were added at the beginning of the biofilm formation.

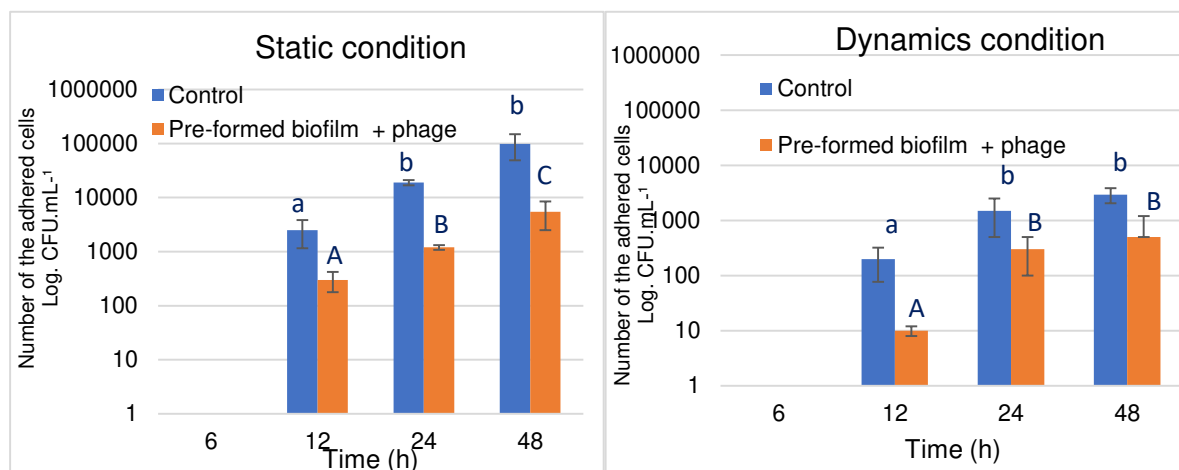


Figure 4. Number of adhered cells at different times during biofilm formation treated with phages. Cells were counted under static and dynamic condition. Error bars represent ± 1 standard deviation. The same letters indicate values that are not significantly different from each other (capital letters and lowercase letters represent significant differences between them).

DISCUSSION

P10 phages were able to control the growth of *P. fluorescens* 1444 and to reduce the number of adhered cells in biofilms, indicating that this phage may be a good alternative for the biocontrol of *P. fluorescens*.

The lack of alternatives for controlling *P. fluorescens* is a challenge to the food industry because this bacterium can contaminate and propagate in milk and milk products even in low temperature. This occurs through the production of heat-stable proteases and lipases that cause spoilage and quality problems (Barbano et al. 2010; Martins et al. 2014; Andreani et al. 2016; Machado et al. 2017). Using phages to control bacteria offers an alternative to chemical agents and antibiotics (Drulis-Kawa et al. 2015; Allen et al. 2017; Gunathilaka et al. 2017).

The surfaces of equipment are widely reported to be sources of biofilms that cause cross-contamination in the food industry. Polystyrene utensils are extremely practical and therefore also widely used in the food industry despite the fact that they often harbour bacterial biofilms (Marinho et al. 2013; Lapointe et al. 2019). In this

study the tested bacterial strain, *P. fluorescens*, adhered to the walls of the polystyrene plates, proving the ability of this genus to colonize these types of surfaces.

The strain was able to adhere to the walls of the polystyrene plates and form biofilms on an abiotic surface after 12h of contact under static and dynamic condition. Two conditions are necessary for biofilms to form. First, nutrients must be present, and second, specific binding proteins must be produced (Flemming and Wingender 2010; García-Gonzalo and Pagán 2015). Bacteria of the genus *Pseudomonas* are known for their ability to produce specific proteins that mediate adhesion between the bacteria and abiotic surfaces (Gallique et al. 2017). These proteins that are produced during biofilm formation determine if the cells will or will not adhere to different types of surfaces (Hinsa and O'Toole 2006; Roy et al. 2017).

The number of adhered cells increased over time under both dynamic and static condition in both tests performed (Figure 3 and 4). However, under static condition the number of adhered cells was higher at all the sampled times, proving that the formation of biofilm was facilitated by this condition. The cells could easily adhere to the walls of the plate when it was still. Similar studies have also observed that *P. fluorescens* biofilms that formed under static condition comprised significantly more cells than biofilms formed under dynamic condition (Sillankorva et al. 2010; Alves et al. 2016).

The P10 phage belongs to the group *Podoviridae*, which is known to exhibit rapid absorption and is an efficient lytic agent (Edgar et al. 2008; Knezevic et al. 2011; Sillankorva et al. 2011). These characteristics make it possible to use this phage as a lytic agent to control its host. The use of phage P10 during biofilm formation and in the treatment of pre-formed biofilms efficiently and significantly reduced the number of adhered cells present under static and dynamic condition. Phage activity was only affected by agitation with pre-formed biofilm at 12 h and resulted in lower numbers of adhered cells. No other differences in phage activity were observed under static and dynamic condition.

Simões et al. (2008) observed that biofilms generated under turbulent flow were significantly less extensive, with decreased metabolic activity and lower protein

and polysaccharide compositions per cell than biofilms generated under laminar flow (Simões et al. 2008).

Adsorption tests showed the ability of P10 phages to adsorb to the membranes of the bacterial strain tested (Figure 2). After 30 min of contact between the phages and the host cells, 89% of the phages had adsorbed to the cell membrane (Figure 1 and 2).

The variations in the phage and *P. fluorescens* counts during the period analyzed indicate the adsorption, penetration, replication, assembly, maturation and release phases, and confirm the ability of P10 phages to prevent increases in the number of adhered cells through cell lysis. For phages to adsorb on the host cell membrane, the presence of specific receptors is crucial (Guerrero-Ferreira et al. 2011). Other important factors include extrinsic condition, biochemical surface interactions, conformational changes in receptor proteins and morphological characteristics of the phage (Moldovan et al. 2007; Rakhuba et al. 2010; Knezevic et al. 2011; Storms and Sauvageau 2015).

Dynamic condition can improve the interaction between phages and bacteria and facilitate the adsorption of a phage on the membrane of a bacterium (Stewart 2015).

Adding phages at the beginning of the biofilm formation (Fig 3) was clearly more efficient ($p < 0,05$) than when they were used to treat pre-formed biofilm (Fig 4). In pre-formed biofilms, the cells are more protected by proteins and extracellular material produced by the bacteria, hindering phage activity and rendering the phage activity less efficient (Harper et al. 2014; Pires et al. 2017).

Other authors observed that under static condition, 4 h of interaction between a phage cocktail and pre-formed biofilm can result in a 3 logs reduction in adhered cells. They also proved that the use of a phage cocktail can be an efficient alternative for reducing biofilm and resulted in a greater than 95% reduction in the biofilm biomass (Alves et al. 2016).

The control of *Pseudomonas* biofilms is especially important because the its may increase the risk of adhesion by other pathogenic bacteria. For example, it highlights the risk of *L. monocytogenes* contamination in pre-formed *Pseudomonas* biofilms (Pang and Yuk 2019).

Phages can inhibit biofilm formation, reduce the number of adhered cells, and in some cases, result in the complete elimination of the biofilm (Pei and Lamas-Samanamud 2014; Lehman and Donlan 2015; Alves et al. 2016). This can occur because some phages can induce the expression of or even carry depolymerizing enzymes that degrade the EPS from within the host genome thus facilitating biofilm removal (Hughes et al. 1998; Azeredo and Sutherland 2008; Sillankorva et al. 2011; Chan and Abedon 2014).

The action of phages against biofilms begins with their replication within the host cells, increasing the numbers of phages in the biofilm. The cells lyse, which reduces the number of cells capable of producing EPS material and thus reduces the potential for regeneration (Harper et al. 2014). A significant reduction in colony forming units was observed (70-90%) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm cultures formed on polystyrene plates when exposed to two different phages for 24 h and 72 h (Danis-Wlodarczyk et al. 2015). In some cases, when the phage used is associated with chemical agents, it can achieve the complete elimination of biofilms (Abdulmir et al. 2015).

The efficiency of the P10 phage in the control and eradication of biofilms depends on factors such as the amount of time that the biofilm has been exposed to the phage, the phage concentration, the phage's mobility and its ability to physically break the structure of the biofilm and to lyse the cells (Abedon 2015; Simmons et al. 2018).

Given the many works that have proven the efficiency of phages to control and eliminate biofilms, using phages is becoming increasingly relevant for addressing the issue of pathogenic bacterial resistance to the sanitizers traditionally used in the food industry.

CONCLUSION

In the food industry, the formation of biofilms is a major issue, because they are frequent sources of cross-contamination in food products and of significant economic loss through the spoilage of foods. Using phage P10 could provide a practical alternative for the biocontrol of *P. fluorescens* strains on polystyrene surfaces. Phage P10 was also efficient in reducing the number of cells present, even in pre-formed *P. fluorescens* biofilms. Phage activity was not influenced by the

dynamic or static condition, except in the case of 12 h pre-formed biofilms, where the activity was enhanced by agitation. Phages were more efficient for preventing or reducing the number of adhered cells in young biofilms than for inhibiting/preventing pre-formed biofilms.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) project number APQ 000289-14 and Félix d'Hérelle Reference Center for Bacterial Viruses.

REFERENCES

- Abdulmir AS, Jassim SAA, Hafidh RR, Bakar FA (2015) The potential of bacteriophage cocktail in eliminating Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms in terms of different extracellular matrices expressed by PIA, *ciaA-D* and *FnBPA* genes. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 14:49. doi: 10.1186/s12941-015-0106-0
- Abedon ST (2015) Ecology of Anti-Biofilm Agents I: Antibiotics versus Bacteriophages. *Pharmaceuticals (Basel)* 8:525–58. doi: 10.3390/ph8030525
- Allen RC, Pfrunder-Cardozo KR, Meinel D, et al (2017) Associations among antibiotic and phage resistance phenotypes in natural and clinical *Escherichia coli* isolates. *MBio*. doi: 10.1128/mBio.01341-17
- Alves DR, Perez-Esteban P, Kot W, et al (2016) A novel bacteriophage cocktail reduces and disperses *Pseudomonas aeruginosa* biofilms under static and flow conditions. *Microb Biotechnol* 9:61–74. doi: 10.1111/1751-7915.12316
- Andreani NA, Carraro L, Fasolato L, et al (2016) Characterisation of the thermostable protease AprX in strains of *Pseudomonas fluorescens* and impact on the shelf-life of dairy products: preliminary results. *Ital J Food Saf* 5:239–244. doi: 10.4081/ijfs.2016.6175
- Azeredo J, Sutherland I (2008) The Use of Phages for the Removal of Infectious Biofilms. *Curr Pharm Biotechnol* 9:261–266. doi: 10.2174/138920108785161604

Barbano DM, Ma Y, Santos MV (2010) Influence of Raw Milk Quality on Fluid Milk Shelf Life. J Dairy Sci 89:E15–E19. doi: 10.3168/jds.s0022-0302(06)72360-8

Caixeta DS, Scarpa TH, Brugnara DF, et al (2012) Chemical sanitizers to control biofilms formed by two *Pseudomonas* species on stainless steel surface. Food Sci Technol 32:142–150. doi: 10.1590/s0101-20612012005000008

Champagne CP, Gardner N (1995) The spot test method for the in-plant enumeration of bacteriophages with paired cultures of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. Int Dairy J 5:417–425. doi: 10.1016/0958-6946(95)00011-Q

Chan B, Abedon S (2014) Bacteriophages and their Enzymes in Biofilm Control. Curr Pharm Des 21:85–99. doi: 10.2174/1381612820666140905112311

Czajkowski R, Ozymko Z, de Jager V, et al (2015) Genomic, proteomic and morphological characterization of two novel broad host lytic bacteriophages ΦPD10.3 and ΦPD23.1 infecting pectinolytic *Pectobacterium* spp. and *Dickeya* spp. PLoS One 10:e0119812. doi: 10.1371/journal.pone.0119812

Danis-Wlodarczyk K, Olszak T, Arabski M, et al (2015) Characterization of the newly isolated lytic bacteriophages KTN6 and KT28 and their efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. PLoS One 10:1–20. doi: 10.1371/journal.pone.0127603

Dourou D, Beauchamp CS, Yoon Y, et al (2011) Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 at different temperatures, on various food-contact surfaces encountered in beef processing. Int J Food Microbiol 149:262–268. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.004

Drulis-Kawa Z, Majkowska-Skrobek G, Maciejewska B (2015) Bacteriophages and phage-derived proteins--application approaches. Curr Med Chem 22:1757–73. doi: 10.2174/0929867322666150209152851

Edgar R, Rokney A, Feeney M, et al (2008) Bacteriophage infection is targeted to cellular poles. Mol Microbiol 68:1107–1116. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06205.x

Fagerlund A, Moretro T, Heir E, et al (2017) Cleaning and Disinfection of Biofilms Composed of *Listeria monocytogenes*. Appl Environ Microbiol 83:1–21.

Flemming H, Wingender J (2010) The biofilm matrix. Nat Rev Microbiol 8:623–33. doi: 10.1038/nrmicro2415

Galié S, García-Gutiérrez C, Miguélez EM, et al (2018) Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. Front Microbiol 9:1–18. doi: 10.3389/fmicb.2018.00898

Gallique M, Decoin V, Barbey C, et al (2017) Contribution of the *Pseudomonas fluorescens* MFE01 type VI secretion system to biofilm formation. PLoS One 12:1–19. doi: 10.1371/journal.pone.0170770

García-Gonzalo D, Pagán R (2015) Influence of Environmental Factors on Bacterial Biofilm Formation in the Food Industry: A Review. Postdoc J. doi: 10.14304/SURYA.JPR.V3N6.2

Gardiner DM, Stiller J, Covarelli L, et al (2013) Genome Sequences of *Pseudomonas* spp. Isolated from Cereal Crops. Genome Announc 1:e00209-13-e00209-13. doi: 10.1128/genomeA.00209-13

Garrett TR, Bhakoo M, Zhang Z (2008) Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. Prog Nat Sci 18:1049–1056. doi: 10.1016/j.pnsc.2008.04.001

Giaouris E, Chorianopoulos N, Doulgeraki A, Nychas GJ (2013) Co-Culture with *Listeria monocytogenes* within a Dual-Species Biofilm Community Strongly Increases Resistance of *Pseudomonas putida* to Benzalkonium Chloride. PLoS One 8:1–14. doi: 10.1371/journal.pone.0077276

Guerrero-Ferreira RC, Viollier PH, Ely B, et al (2011) Alternative mechanism for bacteriophage adsorption to the motile bacterium *Caulobacter crescentus*. Proc Natl Acad Sci 108:9963–9968. doi: 10.1073/pnas.1012388108

Gunathilaka GU, Tahlan V, Mafiz AI, et al (2017) Phages in urban wastewater have the potential to disseminate antibiotic resistance. Int J Antimicrob Agents 50:678–683. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.08.013

Gutiérrez D, Rodríguez-Rubio L, Martínez B, et al (2016) Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry. *Front. Microbiol.* 7:1–15.

Harper D, Parracho H, Walker J, et al (2014) Bacteriophages and Biofilms. *Antibiotics* 3:270–284. doi: 10.3390/antibiotics3030270

Hinsa SM, O'Toole GA (2006) Biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365: A role for LapD. *Microbiology* 152:1375–1383. doi: 10.1099/mic.0.28696-0

Hughes KA, Sutherland IW, Clark J, Jones M V. (1998) Bacteriophage and associated polysaccharide depolymerases - Novel tools for study of bacterial biofilms. *J Appl Microbiol* 85:583–590. doi: 10.1046/j.1365-2672.1998.853541.x

Karimi A, Karig D, Kumar A, Ardekani AM (2015) Interplay of physical mechanisms and biofilm processes: Review of microfluidic methods. *Lab Chip* 15:23–42.

Knezevic P, Obreht D, Curcin S, et al (2011) Phages of *Pseudomonas aeruginosa*: Response to environmental factors and in vitro ability to inhibit bacterial growth and biofilm formation. *J Appl Microbiol* 111:245–254. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05043.x

Kokare CR, Chakraborty S, Khopade AN, Mahadik KR (2009) Biofilm: Importance and applications. *Indian J. Biotechnol.* 8:159–168.

Kostaki M, Chorianopoulos N, Braxou E, et al (2012) Differential biofilm formation and chemical disinfection resistance of sessile cells of *Listeria monocytogenes* strains under monospecies and dual-species (with *Salmonella enterica*) conditions. *Appl Environ Microbiol* 78:2586–2595. doi: 10.1128/AEM.07099-11

Lapointe C, Deschênes L, Ells TC, et al (2019) Interactions between spoilage bacteria in tri-species biofilms developed under simulated meat processing conditions. *Food Microbiol* 82:515–522. doi: 10.1016/J.FM.2019.03.022

Lehman SM, Donlan RM (2015) Bacteriophage-mediated control of a two-species biofilm formed by microorganisms causing catheter-associated urinary tract infections in an in vitro urinary catheter model. *Antimicrob Agents Chemother*

59:1127–1137. doi: 10.1128/AAC.03786-14

Machado SG, Baglinière F, Marchand S, et al (2017) The biodiversity of the microbiota producing heat-resistant enzymes responsible for spoilage in processed bovine milk and dairy products. *Front Microbiol* 8:1–22. doi: 10.3389/fmicb.2017.00302

Makovcova J, Babak V, Kulich P, et al (2017) Dynamics of mono- and dual-species bio film formation and interactions between *Staphylococcus aureus* and Gram-negative bacteria. doi: 10.1111/1751-7915.12705

Marinho AR, Martins PD, Ditmer EM, et al (2013) Biofilm formation on polystyrene under different temperatures by antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from food. *Brazilian J Microbiol* 44:423–426. doi: 10.1590/S1517-83822013005000045

Martins ML, Pinto M, Riedel K, et al (2014) Lack of AHL-based quorum sensing in *Pseudomonas fluorescens* isolated from milk. *Brazilian J Microbiol* 1046:1039–1046.

Martins ML, Pinto UM, Riedel K, Vanetti MCD (2015) Milk-deteriorating exoenzymes from *Pseudomonas fluorescens* 041 isolated from refrigerated raw milk. *Brazilian J Microbiol* 46:207–217. doi: 10.1590/S1517-838246120130859

Matéos a., Guyard-Nicodème M, Baglinière F, et al (2015) Proteolysis of milk proteins by AprX, an extracellular protease identified in *Pseudomonas* LBSA1 isolated from bulk raw milk, and implications for the stability of UHT milk. *Int Dairy J* 49:78–88. doi: 10.1016/j.idairyj.2015.04.008

Moldovan R, Chapman-McQuiston E, Wu XL (2007) On kinetics of phage adsorption. *Biophys J* 93:303–315. doi: 10.1529/biophysj.106.102962

O'Toole GA, Kolter R (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* 28:449–461. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x

Pang X, Yuk HG (2019) Effects of the colonization sequence of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fluorescens* on survival of biofilm cells under

food-related stresses and transfer to salmon. Food Microbiol 82:142–150. doi: 10.1016/j.fm.2019.02.002

Parejko JA, Mavrodi D V, Mavrodi O V, et al (2012) Population Structure and Diversity of Phenazine-1-Carboxylic Acid Producing Fluorescent *Pseudomonas* spp. from Dryland Cereal Fields of Central Washington State (USA). Microb Ecol 64:226–241. doi: 10.1007/s00248-012-0015-0

Pei R, Lamas-Samanamud GR (2014) Inhibition of biofilm formation by T7 bacteriophages producing quorum-quenching enzymes. Appl Environ Microbiol 80:5340–5348. doi: 10.1128/AEM.01434-14

Pires DP, Dötsch A, Anderson EM, et al (2017) A genotypic analysis of five *P. aeruginosa* strains after biofilm infection by phages targeting different cell surface receptors. Front Microbiol 8:1–14. doi: 10.3389/fmicb.2017.01229

Rakhuba D V., Kolomiets EI, Szwajcer Dey E, Novik GI (2010) Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. Polish J Microbiol 59:145–155.

Roy R, Tiwari M, Donelli G, Tiwari V (2017) Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. Virulence 9:00–00. doi: 10.1080/21505594.2017.1313372

Sillankorva S, Neubauer P, Azeredo J (2010) Phage control of dual species biofilms of *Pseudomonas fluorescens* and *Staphylococcus lentus*. Biofouling 26:567–575. doi: 10.1080/08927014.2010.494251

Sillankorva S, Pires D, Oliveira H, et al (2011) The Influence of *P. fluorescens* Cell Morphology on the Lytic Performance and Production of Phage ϕ IBB-PF7A. Curr Microbiol 63:347–353. doi: 10.1007/s00284-011-9987-0

Simmons M, Drescher K, Nadell CD, Bucci V (2018) Phage mobility is a core determinant of phage-bacteria coexistence in biofilms. ISME J 12:532–543. doi: 10.1038/ismej.2017.190

Simões M, Simões LC, Vieira MJ (2008) Physiology and behavior of *Pseudomonas*

fluorescens single and dual strain biofilms under diverse hydrodynamics stresses. Int J Food Microbiol 128:309–316. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.09.003

Stewart PS (2015) NIH Public Access. NIH Public Access 70:212–218. doi: 10.1111/2049-632X.12118.Biophysics

Storms ZJ, Sauvageau D (2015) Modeling tailed bacteriophage adsorption: Insight into mechanisms. Virology 485:355–362.

Vithanage NR, Yeager TR, Jadhav SR, et al (2014) International Journal of Food Microbiology Comparison of identification systems for psychrotrophic bacteria isolated from raw bovine milk. Int J Food Microbiol 189:26–38. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.023

Xin L, Zhang L, Meng Z, et al (2017) Development of a novel loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of lipolytic *Pseudomonas fluorescens* in raw cow milk from north China. J Dairy Sci 100:7802–7811. doi: 10.3168/jds.2017-12740

Xu Y, Chen W, You C, Liu Z (2017) Development of a Multiplex PCR Assay for Detection of *Pseudomonas fluorescens* with Biofilm Formation Ability. J Food Sci 82:2337–2342. doi: 10.1111/1750-3841.13845



Anexo 1.

Projeto de Patente

KITS PARA DETECÇÃO DE *Pseudomonas* e Uso

CAMPO DA INVENÇÃO

- A presente invenção refere-se a kits de detecção de agentes patogênicos e deteriorantes em soluções, alimentos e superfícies, mais especificamente *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas aeruginosa*, obtidos a partir de proteína fágica, selvagem ou modificada, e ao uso dos kits e da proteína fágica.

- O kit de detecção foi desenvolvido a partir de processos de expressão heteróloga da proteína da cauda do bacteriófago UFV-P2, extração, recuperação e utilização da proteína ligada por afinidade a *beads* magnéticos, em sequência colocada em contato com agentes patogênicos e deteriorantes, mais especificamente as bactérias *P. fluorescens* e *P. aeruginosa*, com intuito de se observar aglutinação, indicando a presença destas no conteúdo analisado.

- Os kits de detecção podem ser utilizados para detectar a presença de *P. fluorescens* e *P. aeruginosa* em soluções líquidas e em superfícies, especialmente aquelas superfícies compostas por aço inoxidável de equipamentos na indústria de alimentos, hospitais e outros ambientes onde pode haver suspeita da presença destas bactérias. Laboratórios de microbiologia também podem usar os kits para detectar rapidamente a presença de agentes patogênicos e deteriorante, mais especificamente *P. fluorescens* e *P. aeruginosa*.

ESTADO DA TÉCNICA

- A detecção de agentes patogênicos e deteriorantes em soluções, alimentos e superfícies é essencial para garantir a segurança alimentar em todas as etapas de produção e distribuição.

- As estratégias de controle de contaminações na indústria de alimentos se baseiam principalmente na detecção do microrganismo contaminante e na detecção dos pontos de contaminação ao longo da cadeia produtiva. Para isto, tecnologias simples, ágeis e econômicas são essenciais. Entretanto, grande parte das técnicas existentes são onerosas e dependem de procedimentos de

enriquecimento e incubação das amostras, o que pode levar muitas horas, ou até mesmo dias.

- As análises microbiológicas tradicionais se baseiam na identificação de microrganismos por características fenotípicas verificadas por meio de microscopia e meios diferenciais, testes bioquímicos e imunológicos. Muitas vezes são necessárias etapas de enriquecimento e pré-análises que demandam tempo e recursos, tornando estes métodos caros, demorados e laboriosos.

- A aplicação da técnica de contagem em placas, por exemplo, exige horas para preparação de materiais, emprego de mão-de-obra qualificada e pode levar entre 48 a 72 h para que sejam obtidos resultados preliminares. Entretanto esta técnica é considerada sensível e permite que as colônias possam ser recuperadas e usadas como fonte de rastreamento.

- Técnicas como PCR (reação em cadeia da polimerase) têm emergido como uma alternativa de detecção, principalmente pelo tempo de análise. No entanto, quando comparado ao teste proposto, a PCR possui a desvantagem da necessidade de uso de um equipamento caro, mão-de-obra especializada e tempo de resposta de 1 até 5 h de análise.

- Até as técnicas mais promissoras envolvem um tempo maior que o necessário no teste proposto, além da utilização de equipamentos. Testes rápidos para detecção de microrganismos têm se apresentado como uma alternativa vantajosa, devido à agilidade na resposta, facilidade de manipulação e custo relativamente baixo quando comparado aos métodos tradicionais de detecção.

- Os kits de detecção propostos neste pedido de patente oferece uma alternativa rápida (entre 30 s e 3 min) de detecção de agentes patogênicos e deteriorantes, mais especificamente *Pseudomonas*. Quando comparado à técnica padrão oficial de detecção, a técnica de contagem em placas, os referidos kits se apresentam vantajosos, principalmente no quesito tempo de resposta.

- A invenção descreve a ligação da proteína da cauda do bacteriófago UFV-P2, expressa de forma heteróloga e com cauda, ligada por interação de afinidade a beads magnéticos em um kit de detecção de *Pseudomonas*. A mesma proteína pode ser expressa com diferentes caudas (por exemplo, poli(His)-tag, chitin-binding protein (CBP), maltose-binding protein (MBP), Strep-tag, glutathione-S-transferase (GST), FLAG-tag, etc) e associada por afinidade a outros beads (por exemplo, beads de borracha, de ouro, etc) e outras moléculas, como por exemplo polímeros, membranas, nanotubos, etc. O sistema de detecção descrito dos kits, objetos do atual pedido de patente, consiste em microaglutinação, mas a mesma proteína pode ser usada em sistemas de detecção diversos, incluindo colorimetria (como quando conjugada a ouro coloidal ou polímeros de polidiacetileno), calorimetria, fluorescência, infravermelho, amperometria, potenciometria, condutivimetria, etc.

- A tecnologia de utilização de fagos para o controle de diversos microrganismos consiste em uma técnica natural, não-tóxica e específica. Na indústria, eles têm sido avaliados quanto ao seu potencial uso como agentes sanitizantes, no controle de biofilmes e como agentes de biocontrole. Entretanto, há ainda limitações quanto a essas aplicações devido à sensibilidade dos fagos a determinados fatores extrínsecos como baixo pH, mudanças bruscas de temperatura, baixa atividade de água, entre outros. A perspectiva para uso de proteínas estruturais fágicas é estratégica, já que estas são capazes de reconhecer especificamente estruturas na superfície de seus hospedeiros, são mais estáveis que os fagos às condições supramencionadas, sendo moléculas potenciais para a geração de kits de detecção.

- O uso de fagos para detecção de microrganismos já possui inúmeros relatos na literatura, uma vez que apresentam várias vantagens como alta robustez, rapidez e alta sensibilidade. Além disso, eles detectam apenas células ativas e viáveis. Entretanto, este tipo de ensaio requer conhecimento genético detalhado do fago, além disso, bactérias podem apresentar modificações genéticas que impeçam a infecção fágica, tornando-se resistentes, o que levaria a falsos

negativos. Outra questão relevante é que os fagos repórteres são considerados organismos geneticamente modificados. Como consequência, apesar do grande número de estudos comprovando a eficiência deste tipo de ensaio, os produtos comercialmente disponíveis com base nessa tecnologia não são popularizados.

- Como vantagens da aplicação dos kits propostos podem ser citadas, além daquelas inerentes à facilidade de condução do teste, a rapidez dos resultados como um dos pontos mais relevantes. Com tempos de resposta menores que 5 min, os kits de detecção propostos oferecem uma alternativa prática e rápida para detecção de agentes patogênicos e deteriorantes, mais especificamente *Pseudomonas*, em soluções e superfícies.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

- **FIGURA 01:** Anotação funcional do genoma do fago UFV-P2.
- **FIGURA 02:** Plasmídeo Pet23a⁺ contendo a sequência da proteína mais a sequência da cauda *Strep-tag II* visando à expressão destas sequências.
- **FIGURA 03:** A: Teste de microaglutinação usando os *beads* magnéticos cobertos com a proteína da cauda do fago UFV-P2 na presença de A1) *Pseudomonas aeruginosa*; B1) *Pseudomonas fluorescens*; C1) *Pseudomonas putida*; D1) *Lactococcus lactis*; E1) *Listeria monocytogenes*; e F1) *Escherichia coli* após 1 min de contato.
- **FIGURA 04:** Avaliação do teste de aglutinação com suspensões contendo a bactéria *Pseudomonas fluorescens* durante os tempos de A2) 30 s; B2) 1 min; C2) 3 min; e D2) 5 min de contato entre a bactéria e suspensões contendo os *beads* cobertos com a proteína da cauda do fago UFV-P2.
- **FIGURA 05:** Avaliação do teste de aglutinação com suspensões contendo *Pseudomonas aeruginosa* durante os tempos de A3) 2 min; B3) 3 min; C3) 4 min; D3) 5 min; e E3) Controle após 5 min.
- **FIGURA 06:** Avaliação do teste de aglutinação em biofilmes de A4) *Pseudomonas fluorescens*; B4) *Pseudomonas aeruginosa*; e C4) *Escherichia coli* (controle negativo).

- **FIGURA 07:** Teste de aglutinação em soluções de *swab*. A5) Teste em suspensões contendo *Pseudomonas fluorescens*. B5) Teste em suspensões contendo *Pseudomonas aeruginosa*. C5) Controle.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

- A presente invenção refere-se a kits de detecção de agentes patogênicos e deteriorantes em soluções, alimentos e superfícies, mais especificamente *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas aeruginosa*, obtidos a partir de proteína fágica, selvagem ou modificada, e ao uso dos kits e da proteína fágica. A presente invenção baseia-se na expressão da proteína da cauda do fago UFV-P2 e sua utilização para detectar *Pseudomonas*. Para isso *beads* foram cobertos por ligação de afinidade com a proteína com objetivo de detectar essa bactéria de forma prática e rápida, tendo como sistema de detecção a visualização a olho nu por microaglutinação.

- Proteínas estruturais fágicas estão associadas à especificidade de fagos aos seus hospedeiros. Baseado nesta premissa, a proteína da cauda do fago UFV-P2 foi fusionada a uma cauda de estreptoavidina II, expressa em *E. coli* BL21 e ligada por afinidade a *beads* magnéticos com objetivo de desenvolver um kit de detecção por aglutinação na presença do hospedeiro.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

- A ligação da proteína aos *beads* é possível devido ao fato de esta proteína estar fusionada a uma cauda de estreptoavidina II, adicionada na sequência do plasmídeo que contém também a sequência da proteína para expressão heteróloga. Essa cauda (Strep-tag®II) é composta por 8 aminoácidos, WSH PQFEK, e se liga com elevada especificidade à sequência Strep-Tactin®, presente nos *beads*.

- Por se tratar de ligação por afinidade, outros conjuntos cauda/ligante (cauda fusionada à proteína e ligante fusionado ao *bead*) podem ser utilizados. A cauda de polihistidina, por exemplo, é comumente utilizada na recuperação e purificação de proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade e pode ser usada para ligação a *beads* cobertos com íons de metais como cobre, níquel

e ouro ou borracha. Outros exemplos de caudas comumente associadas a proteínas para ligação por afinidade são a chitin-binding protein (CBP), maltose-binding protein (MBP), Strep-tag, glutathione-S-transferase (GST) e FLAG-tag.

- Os *beads* usados nesta invenção são revestidas com Strep-Tactin®XT, os quais têm alta capacidade de ligação à cauda Strep-tag®II, sendo esta ligação específica. Os *beads* são cobertos com 6% de agarose reticulada às quais o Strep-Tactin®XT é acoplado. O diâmetro médio das partículas é de 25 a 30 µm.

- Diferentes tipos de *beads* podem ser utilizados para construção do kit aqui proposto. *Beads* de poliestireno, por exemplo, já são amplamente utilizados em kits de diagnósticos. Para serem usados, precisa ser possível que os *beads* sejam cobertos com a proteína de interesse, seja por ligações por afinidade ou interações diversas. Outras moléculas também podem ser usadas, como por exemplo polímeros, membranas e nanotubos.

- A proteína da cauda do fago UFV-P2 é responsável pelo reconhecimento de receptores específicos na superfície do hospedeiro, neste caso *P. fluorescens*, o que está diretamente relacionada com a especificidade do fago. Devido a essa característica, essa proteína foi sintetizada em um sistema heterólogo e fusionada a uma cauda para ligação por afinidade, a Strep-tag®II.

- O fago UFV-P2 foi isolado em 2011 pelo Laboratório de Imunovirologia Molecular a partir de água de descarte de uma indústria de produtos lácteos e mostrou grande potencial em retardar a proteólise por *P. fluorescens* em leite desnatado reconstituído, mesmo em altas concentrações dessa bactéria. Além de ensaios de caracterização estrutural, foram realizados o sequenciamento e a análise de seu genoma, no qual foram encontradas 75 ORFs putativas, dentre as quais se destaca a proteína da fibra da cauda (ORF 65: 21,9 kDa). Em bacteriófagos, essa proteína é a principal responsável pelo reconhecimento e adsorção ao hospedeiro, o que a torna uma interessante ferramenta em estratégias para detecção de bactérias.

- O kit de detecção produzido a partir de *beads* magnéticos ligados por afinidade à proteína da cauda do fago UFV-P2 apresentou resultados positivos,

o que é evidente pela formação de um aglutinado (visualizado a olho nu) na presença das bactérias *P. fluorescens* e *P. aeruginosa*.

Produção do plasmídeo recombinante

- Inicialmente, a sequência que codifica a proteína da fibra da cauda do fago UFV-P2 (código de acesso no GenBank AFU 62926.1) foi selecionada, otimizada para expressão em *E. coli* BL21, sintetizada quimicamente e clonada no plasmídeo pET23a+ (GenOne, Brasil). O plasmídeo de expressão foi desenvolvido de forma que a proteína fosse sintetizada fusionada a cauda de estreptoavidina II (StrapTag®II) em sua região N-terminal e possuía uma sequência que confere à bactéria resistência ao antibiótico ampicilina (marca de seleção). Foram incluídos na sequência sintetizada dois sítios de restrição flanqueadores da sequência proteína+cauda para as enzimas *Hind* III e *Nde* I de forma a possibilitar a liberação do inserto por meio de clivagem por enzimas de restrição.

- Foram realizados estudos *in silico* das propriedades dessa proteína. A análise dos parâmetros físico-químicos por meio do *software* ProtParam (ExPASy - SIB Bioinformatics Resource Portal) mostrou que a proteína possui 211 aminoácidos, peso molecular de 21,8 kDa e PI teórico de 6,74 (Tabela 1).

- Após a clonagem, o plasmídeo contendo o gene que codifica para a proteína fusionada à cauda foi introduzido na bactéria *E. coli* BL21, a partir da qual foram produzidas, recuperadas, quantificadas e ligadas aos *beads* por afinidade, conforme descrito a seguir:

Produção das proteínas de interesse

- De forma geral, as proteínas de interesse podem ser produzidas por rota biotecnológica conforme descrito a seguir:

- Introduzir a construção plasmidial contendo a sequência codificadora otimizada (SEQ ID NO: 02) e/ou modificada da proteína no microrganismo (sistema de expressão) por meio do processo de transformação, conjugação ou transdução.

- Incubar as transformantes em meio líquido contendo os nutrientes necessários à multiplicação do microrganismo e o agente apropriado ao marcador de seleção utilizado (por exemplo, ampicilina quando usado o plasmídeo pET23a+).
 - Após multiplicação até que a suspensão atinja Densidade Ótica a 600 nm (DO_{600}) maior que 0,7, utilizar uma alíquota do material para inocular novo meio líquido contendo os nutrientes necessários à multiplicação do microrganismo e o agente apropriado ao marcador de seleção utilizado.
 - Incubar o meio inoculado sob agitação até que a suspensão atinja DO_{600} entre 0,3 e 1,2.
 - Ajustar a temperatura controlada do meio para 25 a 37 °C e adicionar à suspensão o indutor de expressão apropriado ao sistema utilizado, como por exemplo o isopropil beta-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) ou lactose para o sistema *operon lac*, presente no plasmídeo pET23a+, suficiente para a concentração final de 0,05 a 1,00 mM.
 - Manter o material em agitação por até 48 h para produção da proteína de interesse.
 - A produção da proteína ocorre em um meio de cultivo previamente preparado com os nutrientes e antibióticos onde são inoculados os microrganismos capazes de produzir a proteína de forma heteróloga. O meio nutritivo deve ser então mantido sob condições controladas de temperatura, por tempo variado. Durante este tempo, o microrganismo produzirá a proteína de interesse, que permanecerá no interior da célula ou será excretada para o sobrenadante da suspensão.
- Para a produção da proteína da cauda do fago UFV-P2 de forma heteróloga (SEQ ID NO: 03), a adição do indutor é crucial para sua expressão. Para a eficiência desse processo deve-se aguardar um tempo inicial para a adaptação e multiplicação do microrganismo no meio nutritivo, antes de se adicionar o indutor, na concentração desejada.
- Separar as células do sobrenadante por centrifugação ou filtração.

- Caso a proteína (SEQ ID NO: 03) esteja presente no sobrenadante, seguir para o passo de quantificação, se necessário concentração.
- Caso a proteína esteja presente no interior das células sedimentadas, deve-se realizar o processo de recuperação da proteína, conforme descrito a seguir:

Recuperação da proteína

- Para rompimento da célula pode-se utilizar sistemas de rompimento químico ou físico, por exemplo, a sonicação. Para isso, o material sedimentado (células) deve ser ressuspensionado em tampão de lise (100 mM Tris/HCl, pH 8.0 150 mM NaCl 1 mM EDTA) e 1 a 10 mL dessa suspensão devem ser sonicados por 1 a 10 min, a uma potência de 20 a 200 W. A proteína deve ser recuperada a partir da célula rompida, o que pode ser realizado por centrifugação por 10 a 30 min sob 10.000 a 14.000 x *g* ou por filtração. Esses procedimentos permitirão a separação das frações solúvel e insolúvel. A fração solúvel contendo as proteínas de interesse será então utilizada para o protocolo de ligação aos *beads*.
- A possibilidade da presença da proteína na fração insolúvel deve ser considerada. A avaliação se dá adicionando ao extrato de células um agente caotrópico como, por exemplo, até 8 M de ureia ou 3 M de guanidina.
- Para confirmação da obtenção das proteínas de interesse as amostras podem ser submetidas a uma SDS-PAGE.
- Após a produção e extração da proteína, a ligação da proteína aos *beads* é uma das etapas mais relevantes, uma vez que dá origem ao kit de detecção. O Kit de detecção que se trata o presente pedido de patente pode ser utilizado para detectar a presença de agentes patógenos ou deteriorantes, mais especificamente *P. fluorencens* e *P. aeruginos*, em suspensões e superfícies.

Construção do kit de detecção: ligação e testes de aglutinação

- Após a produção/recuperação da proteína de interesse, as mesmas podem ser armazenadas sob refrigeração ou utilizadas para quantificação e ligação aos *beads*.

- Para preparar os *beads* para ligação com a proteína, a suspensão de *beads* deve ser equilibrada com tampão apropriado, a depender do tipo de *bead* e fabricante, e os *beads* devem ser recuperados, por exemplo, por centrifugação, filtração ou em separador magnético.
- Um volume de suspensão de *beads* a de 1 a 10% m/v deve ser adicionado da suspensão contendo a proteína da cauda do fago UFV-P2 fusionada à cauda apropriada para interação por afinidade. As proteínas não ligadas devem ser removidas por meio da lavagem dos *beads* em tampão apropriado. A recuperação pode ser feita, por exemplo, por centrifugação, filtração e, ou uso de separador magnético.
- Neste processo, caso o kit seja feito com outras moléculas que não *beads* de afinidade, protocolo apropriado de montagem/ligação deve ser utilizado para cada caso.
- Após o processo de cobertura os *beads* cobertos com as proteínas da cauda do fago podem ser armazenados preferencialmente a 4 °C.

EXPERIMENTO DE DEMONSTRAÇÃO

Testes de validação do kit para detecção de *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas aeruginosa*

- Avaliação da sensibilidade do kit: Suspensões contendo as bactérias *P. fluorescens* 07A e *P. aeruginosa* em concentrações de 10^1 a 10^7 UFC/mL foram adicionadas a lâminas de vidro e colocadas em contato com os mesmos volumes da suspensão de *beads* cobertos pela proteína viral. A presença ou ausência de aglutinação foi observada em cada tratamento e a sensibilidade do teste definida pela menor concentração de bactéria na qual a aglutinação foi verificada.
- Os resultados de aglutinação foram considerados negativos quando não foi possível observar formação de aglutinado nos 5 primeiros minutos de contato, e o resultado foi confirmado após um período de 5 h.
- **Teste de sensibilidade:** Resultados de aglutinação positiva puderam ser observados nos primeiros 30 s de contato entre os *beads* cobertos pelas

proteínas e as estirpes de *P. fluorescens* testadas. Já nos testes com *P. aeruginosa* a aglutinação foi evidente após 3 min de contato.

- Diferentes concentrações de bactéria também foram testadas e a menor concentração detectável de *P. fluorescens* foi 10^3 UFC/mL e 10^4 UFC/mL para *P. aeruginosa*.

- Avaliação da especificidade do kit: A especificidade do kit de detecção foi avaliada utilizando as espécies de *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* e *P. putida*, além de *E. coli*, *Lactococcus* sp. e *Listeria monocytogenes*. A presença ou ausência de aglutinação foi observada em cada tratamento.

- **Teste de especificidade:** O teste de aglutinação foi positivo para as espécies de *P. fluorescens* e *P. aeruginosa* e apresentou aglutinação negativa para *P. putida*. Também não foi observada aglutinação para as estirpes de *E. coli*, *Lactococcus* sp. e *L. monocytogene*.

Validação do uso do kit para detecção de *Pseudomonas* sobre superfícies contendo biofilmes e em swabs

- Cartões compostos de aço inoxidável foram imersos em caldo nutriente contendo a bactéria *P. fluorescens* 07A na concentração de 10^5 UFC/mL e incubados a 30 ou 37 °C em um período variando de 48 a 72 h para que houvesse a formação de biofilmes pela bactéria sobre a superfície dos cartões. Estes foram recuperados e lavados com solução PBS pH 7,4 para remover as células não aderidas.

- Para a contagem das bactérias aderidas aos biofilmes, os cartões de aço inox foram lavados em tampão PBS e imersos em banho de ultrassom para liberação das células aderidas. A suspensão resultante foi diluída em solução salina e plaqueada em meio LB.

- A eficiência do kit de detecção foi avaliada adicionando de 10 a 50 µL da solução de *beads* cobertos pela proteína do fago diretamente sobre a superfície dos cartões de aço inox contendo o biofilme. A presença ou ausência de aglutinação foi observada em cada tratamento.

- Um “swab” comercial foi passado três vezes ao longo do cartão contendo o biofilme e, então, imerso em 1 mL de solução salina estéril. O sistema foi agitado e utilizado para o teste de microaglutinação na proporção de 10 a 50 µL de suspensão de *beads* para o mesmo volume da solução do *swab*. A presença ou ausência de aglutinação foi observada em cada tratamento.

- **Testes em biofilmes:** Nos testes em biofilmes de *P. fluorescens* a aglutinação foi observada no primeiro minuto de contato e nos biofilmes de *P. aeruginosa* após 2 min. Não houve diferença no tempo de aglutinação em biofilmes com 24 e 48 h de formação. Biofilmes com 72 h apresentaram aglutinação mais lenta, sendo observada aglutinação em biofilmes de *P. fluorescens* após 4 e 5 min.

- Nos testes em soluções de swabs a aglutinação foi observada após 3 min.

- Não houve aglutinação nos biofilmes de *E. coli* em todos os tempos de formação de biofilmes testados.

VANTAGENS DO KIT DE DETECÇÃO PROPOSTO

- A detecção de bactérias do gênero *Pseudomonas* normalmente envolve um período de incubação e plaqueamento em ágar seletivo, tais como ágar Mac-Conkey e meio à base de ceftriaxona. A identificação bioquímica por meio de kits, como por exemplo, o API 20 NE, é comumente usada para identificação, entretanto, a maioria deles apresenta uma taxa de erro relativamente alta. Além disso, o teste requer tempo mínimo de incubação de 48 h, exigindo pelo menos 3 dias de propagação. Outras técnicas como reação em cadeia da polimerase (PCR) e kits de detecção envolvendo fluorescência também podem ser usados na detecção de microrganismos, no entanto ambos necessitam de equipamentos caros e manuseamento complexo para obtenção do resultado.

- O kit de detecção proposto é composto de uma solução de *beads* cobertos com uma proteína fágica e oferece uma resposta rápida na forma de

aglutinação quando em contato com soluções e superfícies contendo biofilmes de *P. fluorescens* e *P. aeruginosa*.

- A aglutinação que ocorre pode ser observada a olho nu após 30 s (para *P. fluorescens*) ou 3 min (para *P. aeruginosa*) de contato, o que é rápido e prático em termos de aplicação em indústrias e hospitais.
- As vantagens desta tecnologia envolvem rapidez no resultado e praticidade no manuseio. O resultado pode ser visualizado sem necessidade de suporte de qualquer aparelho.

LISTA DE FIGURAS – PROPOSTA DE PATENTE

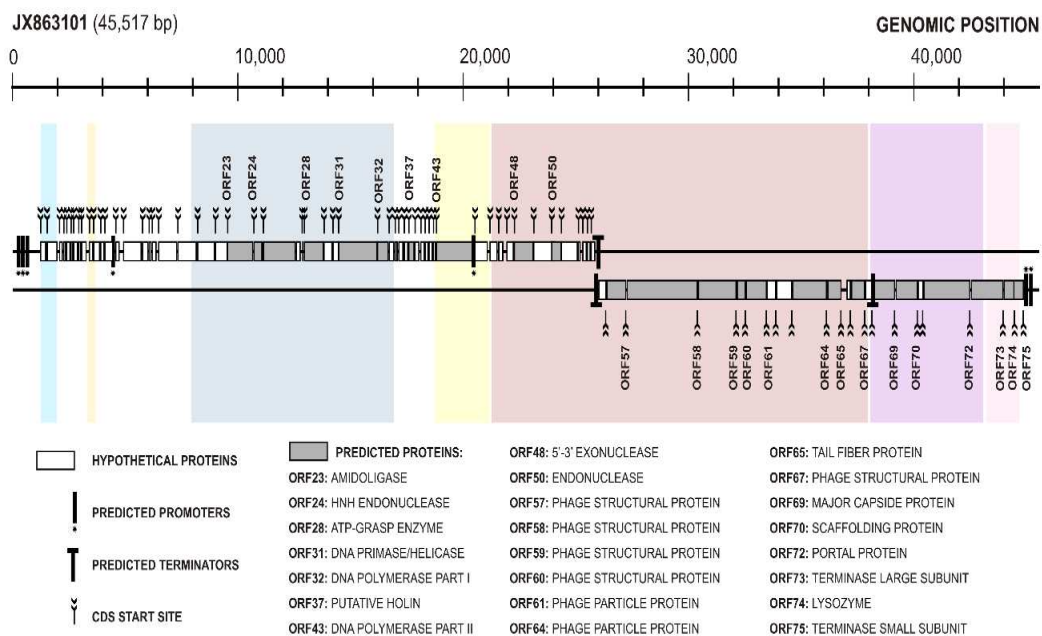


FIGURA 1. Anotação funcional do genoma do fago UFV-P2. Fonte: Eller, 2014

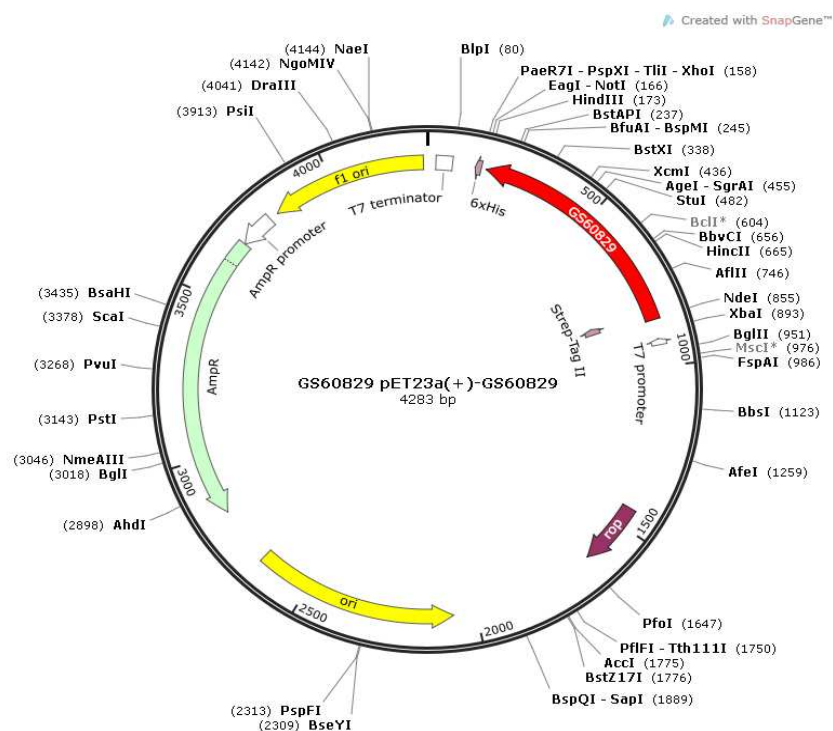


FIGURA 2. Plasmídeo Pet23a+ contendo a sequência da proteína

TABELA 1. Caracterização da proteína

Número de Aminoácidos	211
Peso molecular	21877.8
pI teórico	6.74
Composição de aminoácidos	Ala (A) 16 7.6% Arg (R) 3 1.4% Asn (N) 17 8.1% Asp (D) 6 2.8% Cys (C) 2 0.9% Gln (Q) 3 1.4% Glu (E) 5 2.4% Gli (G) 27 12.8% His (H) 9 4.3% Ile (I) 13 6.2% Leu (L) 19 9.0% Lis (K) 7 3.3% Met (M) 5 2.4% Phe (F) 8 3.8% Pro (P) 16 7.6% Ser (S) 13 6.2% Thr (T) 23 10.9% Trp (W) 2 0.9% Tyr (Y) 3 1.4% Val (V) 14 6.6% Pyl (O) 0 0.0% Sec (U) 0 0.0% (B) 0 0.0% (Z) 0 0.0% (X) 0 0.0%
Composição Atômica	Carbono C 973 Hidrogênio H 1527 Nitrogênio N 267 Oxigênio O 293 Enxofre S 7

Fórmula	$C_{973}H_{1527}N_{267}O_{293}S_7$
Coeficiente de Extinção	15595

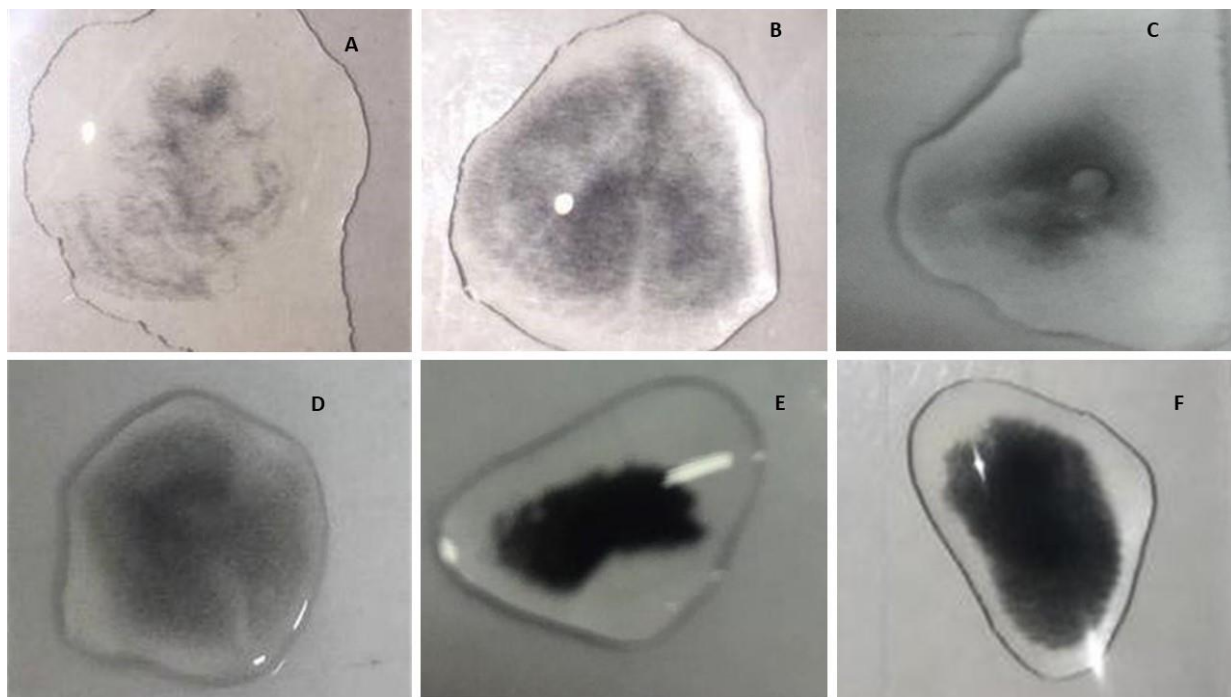


FIGURA 3. Teste de aglutinação em diferentes espécies. A: *P. aeruginosa*; **B:** *P. fluorescens*; **C:** *Pseudomonas putida*; **D:** *Lactococcus lactis*; **E:** *Listeria monocytogenes*; **F:** *Escherichia Coli*.

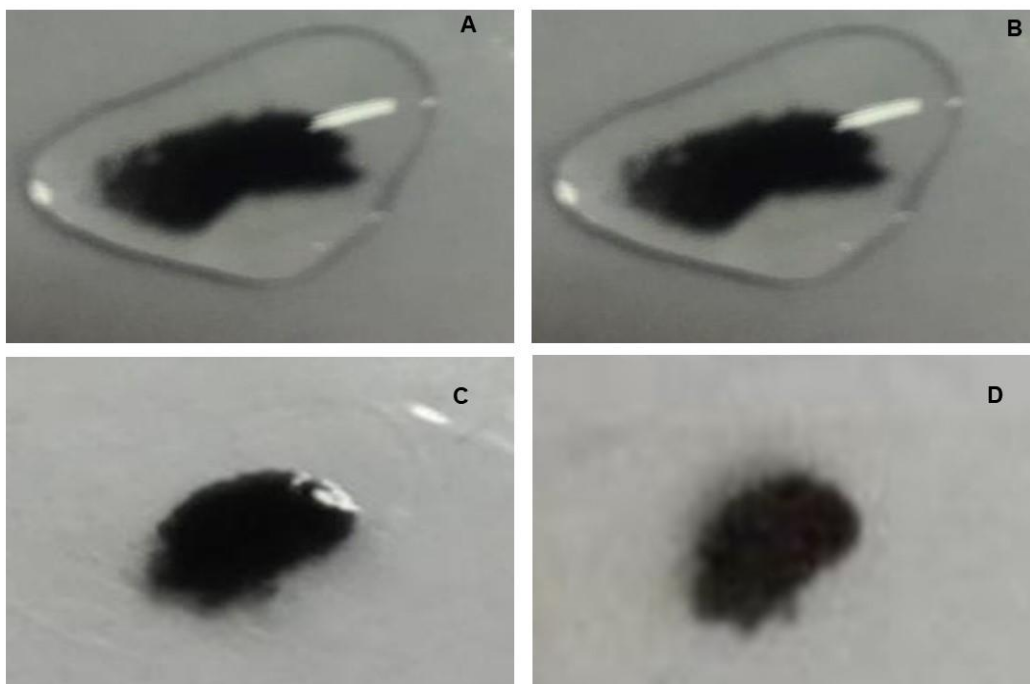


FIGURA 4. Teste de aglutinação em *P. fluorescens* A: 30 s; B: 1 min; C: 3 min; D: 5 min

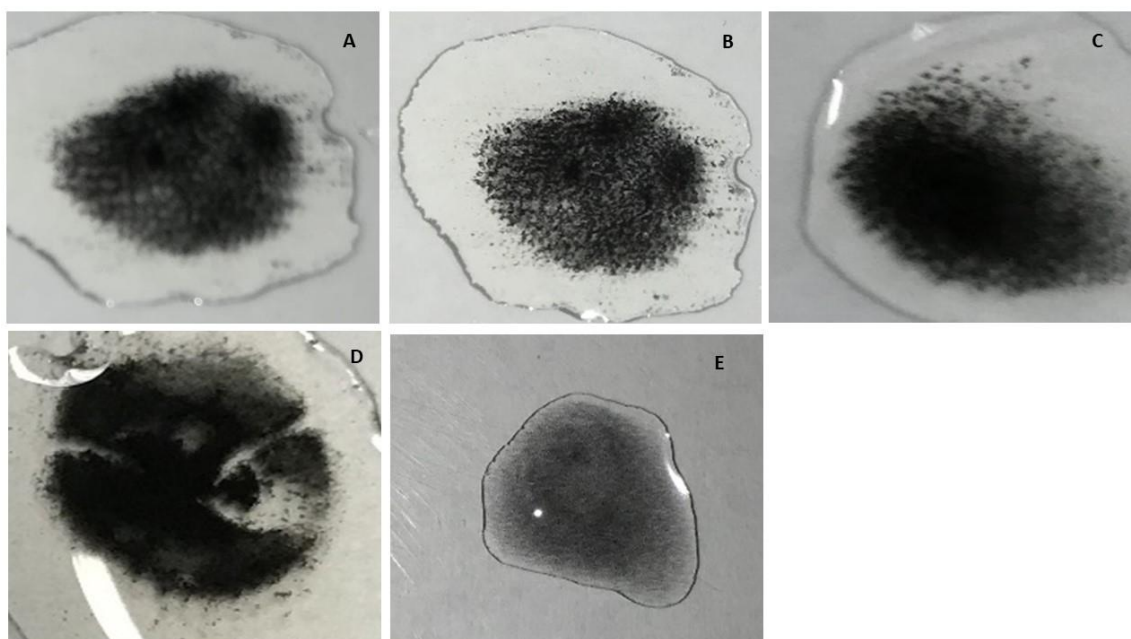


FIGURA 5. Teste de aglutinação em *P. aeruginosa*. A: 30 s; B: 1 min; C: 3 min; D: 5 min; E: Controle após 5 min.

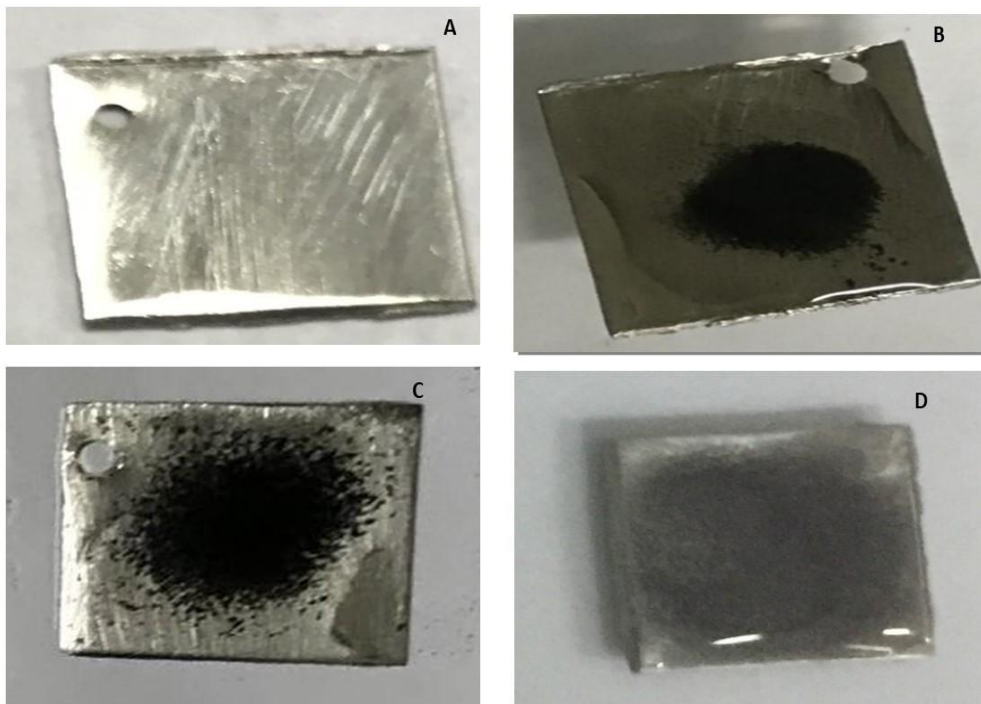


Figura 6. Teste de aglutinação em biofilmes de *P. fluorescens*. **A:** Cupom inox antes da indução da formação de Biofilme. **B:** Biofilmes de *P. fluorescens*; **C:** Biofilmes de *P. aeruginosa*; **D:** Controle (biofilme de *E. coli*).

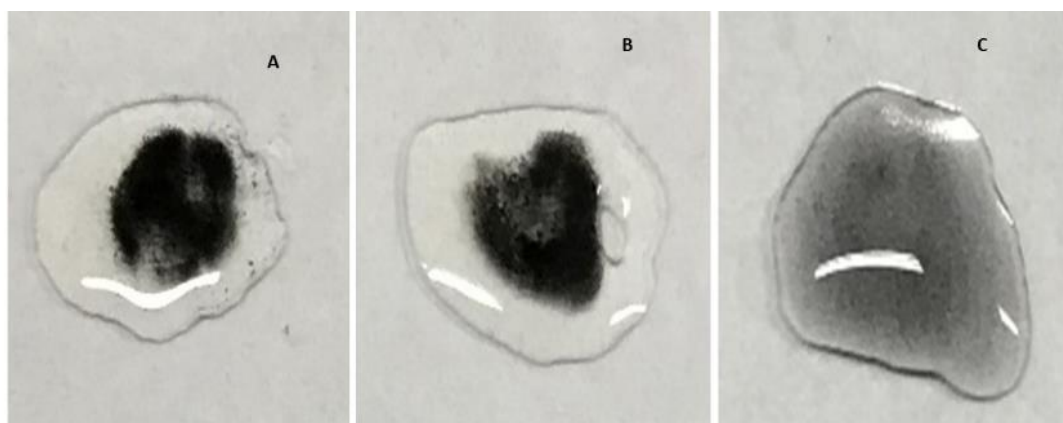


FIGURA 7. Teste de aglutinação em soluções de swab. **A:** Teste em solução contendo *P. fluorescens*. **B:** Teste em solução contendo *P. aeruginosa*. **C:** Controle.