

ROBERTO SOUSA DIAS

**CONTROLE DE BIOFILMES EM MEMBRANAS DE OSMOSE INVERSA
ATRAVÉS DE BACTERIÓFAGOS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

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

T

D541c
2014
Dias, Roberto Sousa, 1983-
Controle de biofilmes em membranas de osmose inversa
através de bacteriófagos / Roberto Sousa Dias. – Viçosa, MG,
2014.
ix, 60f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Sérgio Oliveira de Paula.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.53-60.

1. Biofilme. 2. Bacteriologia. 3. Bactérias - Morfologia. 4.
Arthrobacter. 5. *Podoviridae*, Osmose. 6. Petróleo - Refinarias.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Geral. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e
Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 579.3

ROBERTO SOUSA DIAS

**CONTROLE DE BIOFILMES EM MEMBRANAS DE OSMOSE INVERSA
ATRAVÉS DE BACTERIÓFAGOS**

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

APROVADA: 3 de setembro de 2014

Cláudio Mudadu Silva

Valéria Maia Oliveira

Javier Vega Ramos Abelardo Silva Júnior

Sérgio Oliveira de Paula
(Orientador)

Agradecimentos

Agradeço a Deus em primeiro lugar, pois é o alicerce no qual me apoiei durante todos esses anos!

Agradeço aos meus pais, Dores e Arnaldo, por tudo!! Vocês são os maiores exemplos que tive na vida, isso tudo é muito mais seus que meu...

À minha irmã Carol, por segurar a minha onda por várias vezes nessa vida, valeu Carolzinha! Você é muito importante pra mim!

À minha família, em especial à minha avó Zezé, meus tios nas pessoas do Tio Armando, Tia Dirce, Tia Dora, Tio Bento e Robertão, pelo apoio incondicional. Lui, tô chegando! Vamos ser colegas de profissão!!

Ao Sérgio, amigo e orientador por todos esses anos de amizade e conhecimentos transmitidos!

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade e por ter dado condições para a realização deste estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, ao coordenador do curso, Prof. José Eduardo Serrão, e aos professores da pós-graduação, pela oportunidade.

À PETROBRAS pelo imprescindível apoio financeiro.

À Michele e a Carine, companheiras no laboratório de Imunovirologia.

Aos meus queridos estagiários e ex-estagiários, hoje colegas de profissão: Livinha, Vinícius, Naira, Lari, Jamily; Meu mais sincero obrigado!!

Ao ilustre João Lúcio. Jones, muito obrigado meu amigo!

Aos amigos do Laboratório de Imunovirologia Molecular, que tornaram esse caminho mais agradável: Juju, Xisto, Luan, Rodrigo, Aniele, Mary Hellen, André e Ana Flávia.

Aos amigos de Bocaiuva, que acreditaram em mim e sempre me deram força: Digas, Pedrão, Guinha, Lara, Erley, Esdras, Robertinho, Gordi, Fredinho e Bambas. Valeu galera!!!

À Larissa Quartaroli, por todo apoio nos experimentos com o sistema de osmose e pela amizade!

Aos amigos de Viçosa: Moraci (Farofa), Caio (Chupinsky), Vinicius (Palmitato), Ricardo (Bituquinha), Lucão, Murilo, Thiago (Bebê), Otávio (Calango), Gustavo (Patolino), Rafael (Iconha), Fernandinha (Batata), Silvana (Nuvem negra.. rrsrsr) pelo

companheirismo durante toda a caminhada, que começou no alojamento Pós e que não acaba aqui.

Agradeço ao Núcleo de Microscopia e Microanálise, sobretudo à Karla e ao Gilmar por toda a ajuda nessa caminhada. Boa parte dessa tese foi feita lá.

À minha namorada Keila pelo companheirismo durante toda essa caminhada.

Agradeço aos membros da banca e suplentes: Dr. Javier Veja, Dr. Abelardo Silva, Dr. Claudio Mudadu, Dr^a Valéria Maia, Dr^a Cynthia Silva e Dr^a Aline Dias.

Agradeço todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigado!

Biografia

Roberto Sousa Dias nasceu na cidade de Bocaiuva, norte de Minas, filho de Maria das Dores Reis e Arnaldo Dias, no dia 10 de junho de 1983.

No ano de 2004 se mudou para Viçosa para cursar o bacharelado em bioquímica, onde se formou em julho de 2009, após ser bolsista de iniciação científica, tendo trabalhado no isolamento e avaliação de bacteriófagos específicos contra *Staphylococcus aureus* causadoras de mastite bovina. Ainda no mesmo ano, foi aprovado no programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural para cursar o mestrado, sob orientação do Prof. Dr. Sérgio O. de Paula, onde continuou na linha de fagos contra bactérias de interesse veterinário.

No ano de 2011, após a obtenção do título de mestre em ciências foi selecionado para cursar o doutorado em Biologia Celular e Estrutural, com financiamento da PETROBRAS, trabalhando com bacteriófagos no controle de biofilmes em ambientes relacionados a petróleo e término previsto para setembro de 2014.

Resumo

DIAS, Roberto Sousa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2014.

Controle de biofilmes em membranas de osmose inversa através de bacteriófagos.

Orientador: Sérgio Oliveira de Paula.

Alguns segmentos industriais são conhecidos por produzir grandes quantidades de efluentes salinos, entre eles pode-se destacar o setor petroquímico. Com a crescente busca por tecnologias que permitam a reciclagem da água, os sistemas de osmose inversa (OI) tem ganhado grande atenção por parte do setor industrial e de pesquisadores em todo o mundo. As incrustações (*fouling*) são o principal entrave encontrado nesses sistemas por causarem redução expressiva no fluxo e podem ter diversas origens, sendo a bioincrustação, caracterizada pela formação de biofilme de origem microbiana na superfície da membrana, a mais importante. Neste trabalho foi avaliada a capacidade do fago vB_AspP-UFV1, específico contra bactérias do gênero *Arthrobacter*, submetido a análises morfológicas e moleculares e isolado a partir de sistemas de lodos ativados, no controle de biofilme formado por bactérias obtidas da água de alimentação de sistemas de osmose inversa de refinarias de petróleo. Os resultados mostraram se tratar de um fago da família *Podoviridae*, ordem *Caudovirales*, com genoma de aproximadamente 22 Kb. As técnicas de cristal violeta e microscopia eletrônica de varredura demonstraram a capacidade do fago em reduzir a formação do biofilme na maioria das bactérias avaliadas, chegando a 87% de redução em alguns isolados, o que demonstra a viabilidade do uso de bacteriófagos como alternativa aos atuais métodos de controle microbiológico em sistemas industriais. Foi avaliada a formação de biofilme na superfície de membranas, operadas por 30 dias em um sistema piloto de osmose inversa, na filtração de efluente industrial proveniente de refinaria de petróleo. Foi observada a presença de biofilme espesso após 15 dias de operação, além da quase completa ausência de células viáveis no trigésimo dia. Foram isolados outros 5 fagos específicos contra as bactérias encontradas na água de alimentação do sistema de osmose inversa, visando assim a constituição de um coquetel fágico contendo fagos específicos e inespecíficos com potencial aplicação no controle de biofilme em sistemas de osmose inversa.

Abstract

DIAS, Roberto Sousa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2014. **Biofilms control on reverse osmosis membranes by bacteriophages.** Advisor: Sérgio Oliveira de Paula.

Some industries are known to produce large amounts of saline effluents, among them we can highlight the petrochemical industry. With the increasing search for technologies that allow recycling of water, reverse osmosis systems (RO) has gained great attention from researchers and industrial sector around the world. Fouling is the main obstacle encountered by these systems, its cause a significant reduction in the flow and may have various origins, being biofouling, characterized by the formation of microbial biofilm on the membrane surface, the more important. This work evaluated the ability of phage vB_AspP-UFV1, specific against bacteria of the genus *Arthrobacter*, subjected to morphological and molecular analyzes and isolated from activated sludge systems, in control of biofilm formed by bacteria obtained from oil refineries feed water reverse osmosis system. The results show approximately 22 Kb genome *Podoviridae* family phage, order *Caudovirales*. The techniques of crystal violet and scanning electron microscopy demonstrated the ability of phage to reduce biofilm formation in most bacteria assessed, achieving 87% reduction for some isolates, which demonstrates the feasibility of using bacteriophages as alternative to current methods of microbiological control in industrial systems. Biofilm formation was assessed on the surface of the membranes in a filtration of industrial wastewater from oil refinery, operated for 30 days in a pilot reverse osmosis system. The presence of thick biofilm after 15 days of operation was observed in addition to the almost complete absence of viable cells on the thirtieth day. Five specific phages against bacteria found in the feed water of reverse osmosis system were isolated, thus aiming at the establishment of a phage cocktail containing specific and unspecific phages with potential application in biofouling control.

Sumário

1	Introdução	1
2	Revisão bibliográfica	3
2.1	Osiose inversa.....	3
2.2	Biofilme	8
2.3	Bacteriófagos	11
3	Objetivos.....	19
3.1	Objetivos gerais	19
3.2	Objetivos específicos.....	19
4	Metodologia.....	20
4.1	Linhagens bacterianas	20
4.2	Isolamento bacteriano a partir de amostras de lodo ativado.....	20
4.3	Identificação bacteriana.....	22
4.4	Isolamento de bacteriófagos	22
4.5	Propagação viral	23
4.6	Caracterização morfológica.....	24
4.7	Caracterização molecular dos bacteriófagos	24
4.7.1	Caracterização genômica	24
4.7.2	Random Amplified Polymorphic DNA – RAPD.....	25
4.8	Análise de formação de biofilme.....	25
4.9	Controle da formação de biofilme por fagos	26
4.9.1	Sistema MBEC.....	26
4.9.2	Sistema alternativo	26
4.10	Análise de formação de biofilme em membranas de osiose inversa.....	27
4.10.1	Sistema piloto de osiose inversa	27
4.10.2	Microscopia eletrônica de varredura.....	28
4.10.3	Microscopia de varredura confocal a laser.....	28
5	Resultados.....	30
5.1	Isolamento bacteriano a partir de lodos ativados	30
5.2	Isolamento e propagação de bacteriófagos.....	30
5.3	Caracterização morfológica.....	30
5.4	Caracterização molecular de bacteriófagos	33
5.4.1	RAPD	33
5.4.2	Peso molecular e composição genômica.....	34

5.5	Avaliação da formação de biofilme dos isolados bacterianos.....	35
5.6	Análise da influência de fagos na formação de biofilme	35
5.7	Análise de dose dependência na influencia do fago UFV1 sobre o biofilme...	36
5.8	Caracterização do biofilme formado nas membranas de osmose inversa	39
5.8.1	MEV	39
5.8.2	Confocal	42
5.9	Isolamento e propagação de fagos específicos.....	44
5.10	RAPD fagos específicos	44
6	Discussão	46
7	Conclusões	51
8	Perspectivas	52
9	Referências bibliográficas.....	53

1 Introdução

O petróleo é a principal fonte de energia e renda para muitos países hoje, o que coloca sua produção como uma das atividades industriais mais importantes do século XXI. Desde o final da década de 1850, quando Edwin Drake perfurou o primeiro poço de petróleo, a demanda por petróleo continuou a subir. Estima-se que o consumo mundial diário de petróleo passará de 85 milhões de barris em 2006 para 106,6 milhões de barris em 2030. Apesar da sua importância, o petróleo é produzido com grandes volumes de resíduos, sendo os efluentes líquidos mais de 80% dos resíduos gerados, chegando a 95% em campos petrolíferos envelhecidos. Geralmente, a razão em volume de óleo/água é de 1:3 (Igunnu & Chen, 2012).

A tendência atual em gestão de águas residuárias industriais se concentra na prevenção da poluição, seja pela redução do uso de recursos naturais ou na aplicação de tecnologias limpas, com baixo impacto ambiental. Embora o reuso total da água não seja viável, podendo não ser necessário em todos os casos, trata-se de uma alternativa para as indústrias com elevado consumo de água. Neste sentido, a tecnologia de membranas de osmose inversa tem sido amplamente utilizada por várias indústrias, tais como refinarias de petróleo (Salahi et al, 2010). Osmose inversa é um processo que utiliza alta pressão, onde a pressão osmótica da solução de alimentação é suprimida mediante a aplicação de uma pressão hidráulica que força a água limpa (permeado) a difundir através da membrana, densa e não porosa, contra seu gradiente osmótico (Spiegler & Kedem, 1966). No entanto, a adesão e crescimento de microorganismos e subsequente bioincrustação, representam um inconveniente associado com a utilização desta tecnologia (Farias et al, 2014).

Os biofilmes são comunidades microbianas que se desenvolvem aderidas à superfície e circundadas por substâncias de origem polissacarídica extracelular (exopolissacarídeos - EPS) (Huq et al, 2008; Stoodley et al, 2002). Como comunidades microbianas complexas, biofilmes são constituídos por diversas espécies, ocupando o mesmo ambiente funcional, em um nível de complexidade organizacional. Possuem estrutura distinta e especializada, com atividades particulares, que dependem das relações entre os seus constituintes (Wimpenny, 2000). Muitos fatores estão associados à formação de biofilmes na superfície de membrana de osmose inversa, incluindo as propriedades da água de alimentação, como por exemplo, a composição da comunidade

microbiana planctônica. Bactérias presentes em biofilmes apresentam grande resistência aos agentes biocidas comumente utilizados, algumas possíveis explicações sejam: a característica impenetrável do biofilme, impedindo que os agentes alcancem as células, o baixo crescimento de células aderidas, alterações genéticas e respostas adaptativas (Son et al, 2010).

Desde o início do século passado, quando foram descobertos, os bacteriófagos e seu efeito destrutivo sobre os organismos hospedeiros têm sido explorados com o intuito de desenvolver estratégias para o controle de bactérias. Além disso, têm sido proposto o uso de enzimas, lisinas ou endolisinas, como potentes agentes antibacterianos (Loeffler et al, 2001; Loessner, 2005; Oechslin et al, 2013). As endolisinas são enzimas que degradam a parede celular de bactérias, são peptidoglicano hidrolases que estão envolvidas na quebra da parede celular bacteriana, permitindo assim a liberação de progênie de fagos.

Neste trabalho fagos líticos, específicos e não específicos, foram isolados, caracterizados e avaliados, quanto sua capacidade no controle da formação de biofilme por bactérias isoladas em águas de alimentação de sistemas de osmose inversa. Também foi analisada a formação de biofilme em membranas de osmose inversa filtrando efluente de uma refinaria de petróleo ao longo de 30 dias. Além do isolamento de fagos específicos visando a confecção de coquetéis fágicos e sua utilização no controle de biofilme em sistemas de osmose inversa.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Osmose inversa

Com a crescente preocupação por fontes de água limpa e segura, a busca por tecnologias que proporcionem a purificação da água, de maneira eficiente se tornou fundamental (Gu et al, 2013). Neste contexto, a osmose inversa(OI) surge como principal tecnologia na relação energia/eficiência, sendo a tecnologia de membrana mais amplamente utilizada em todo mundo, aplicada na dessalinização de água, produção de água potável e mais recentemente no tratamento terciário de águas residuárias, o que faz com que ganhe cada vez mais aceitação mundial (Kang & Cao, 2012; Perez-Gonzalez et al, 2012).Metade da água dessalinizada nos Estados Unidos, Europa e Japão por meio da osmose inversa, tem como o objetivo o uso industrial e a outra metade da demanda mundial se concentra principalmente no oriente médio e regiões desérticas, onde essa água é usada para abastecimento domiciliar(Baker, 2004).

No ano de 1931, cerca de 80anos após os primeiros estudos com cerâmicas e osmose, o processo de dessalinização com membranas foi patenteado e o termo osmose inversafoi cunhado (Baker, 2004). Osmose inversa é um processo de dessalinização da água pela utilização de membranas semipermeáveis, sendo permeáveis à água e impermeáveis a diversos sais dissolvidos. A exclusão molecular dos solutos presentes se dá devido ao diâmetro das partículas, à carga e por interações físico-químicas entre o soluto, o solvente e a membrana, resultando em dois fluxos contínuos: o permeado, constituído pela água pura que atravessa os poros da membrana e o concentrado, material retido que requer maior atenção no descarte, devido à presença de altas concentrações de sais e outros solutos. O fluxo de agua através da membrana segue a equação:

$$J_i = A(\Delta p - \Delta \pi)$$

Onde J_i é o fluxo de água, Δp a diferença de pressão através da membrana, $\Delta \pi$ a diferença de pressão osmótica através da membrana e A uma constante relacionada às características da membrana. Enquanto, a equação que descreve o fluxo de sal é:

$$J_j = B(C_{j_0} - C_{j_1})$$

Onde J_j é o fluxo de sal através da membrana, B a constante de permeabilidade do sal e C_{J_0} e C_{J_1} as concentrações salinas nos lados de alimentação e do permeado respectivamente. Como a concentração C_{J_0} é muito maior que C_{J_1} , a equação se torna:

$$J_j = BC_{J_0}$$

Assim, enquanto o fluxo de água é proporcional à diferença de pressão, o fluxo de sal é independente da pressão a que o sistema esteja submetido, fazendo com que a seletividade da membrana aumente com o aumento da pressão (Baker, 2004; Malaeb & Ayoub, 2011; Perez-Gonzalez et al, 2012). Algumas das características mais vantajosas da tecnologia de membranas são as dimensões reduzidas e construção modular, permitindo a combinação com outros processos de tratamento (Chelme-Ayala et al, 2009; Ghosh et al, 2011; Perez-Gonzalez et al, 2012), tais como os sistemas de lodos ativados e ultrafiltração. Algumas características dos sistemas de OR são de fundamental importância no desempenho, sobretudo a composição e o tipo de membrana, além do design do sistema, que pode ser em espiral, fibra oca ou tubular, sendo as espirais mais utilizadas em escalas industriais (Baker, 2004). O principal foco de estudo em sistemas de osmose inversa são as membranas, diversas modificações vem sendo desenvolvidas com o objetivo reduzir a incrustação de materiais orgânicos e inorgânicos, sobretudo a incrustação biológica ou biofilme.

As membranas podem ser formadas por um único polímero ou compostas, contendo duas ou mais camadas (Malaeb & Ayoub, 2011). O material pelo qual é formada a membrana possui papel fundamental na exclusão de diversos compostos, como sais ou outras moléculas de interesse (Rautenbach et al, 1989). Membranas formadas por acetato de celulose foram desenvolvidas no ano de 1959, entretanto, somente com a descoberta de membranas de acetato de celulose anisotrópicas a tecnologia de osmose inversa se tornou mais prática, o que levou a instalação de alguns módulos poucos anos depois, nos formatos tubulares ou “*plate and frame*” (Baker, 2004). As membranas anisotrópicas foram o padrão mundial até o ano de 1978, quando J. E. Cadotte desenvolveu o método de produção de membranas compostas por polimerização interfacial pela ligação interfacial cruzada de piperazina com uma mistura de cloreto de trimetiloil e cloreto de isoftaloil, o qual garantia maior repulsão aos íons salinos e um bom fluxo de água através da membrana (Baker, 2004; Lau & Ismail, 2011).

Membranas de acetato de celulose e poliamidas aromáticas são os melhores materiais poliméricos conhecidos, utilizados em sistemas de OI. Acetato de celulose, triacetato de celulose e uma mistura de acetato e triacetato de celulose são produzidas normalmente de forma assimétrica, o que determina um menor fluxo quando comparado com as novas tecnologias de compósito de camada fina. As membranas de fina camada apresentam diversas outras vantagens sobre as membranas de celulose, entre elas a menor susceptibilidade à ataques microbianos, membranas de celulose sofrem compactação quando submetidos à altas pressões e possuem limitada estabilidade química, sendo as membranas de compósito de camada fina mais resistentes às variações de pH (Ghosh et al, 2011). As membranas comerciais mais recentes utilizam o design de compósitos de fina camada, as quais consistem de uma camada seletiva de poliamidas (PA) altamente reticuladas (~0,2-0,25 μm) sobre um suporte polimérico de polissulfonas (~40-50 μm) com microporos e um suporte estrutural (~100 μm). Nesta configuração a separação da água dos solutos é feita pela camada de PA. As características estruturais, como composição química, topologia molecular e homogeneidade da camada de poliamida são cruciais para o controle da permeabilidade seletiva da membrana. Tradicionalmente a camada de poliamida é obtida pela polimerização interfacial de *m*-fenilenodiamina e cloreto de trimesoil (Figura 1) sobre

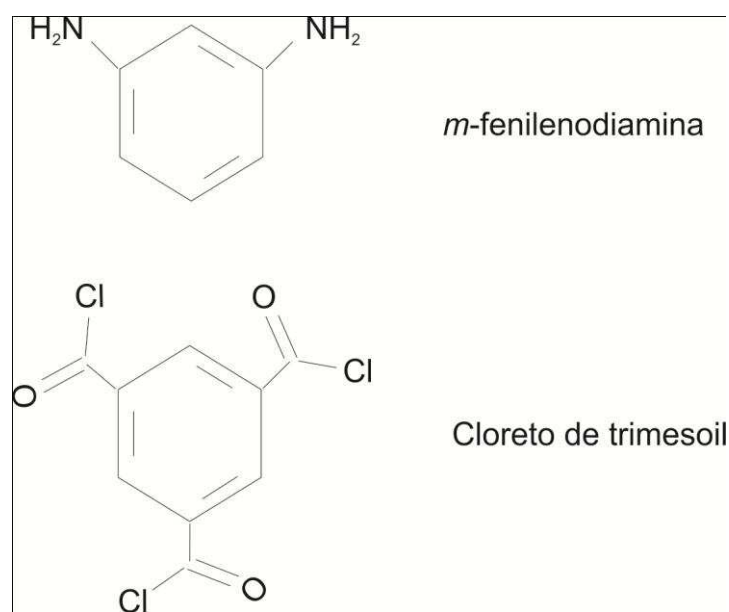


Figura 1 Os compostos *m*-fenilenodiamina e cloreto de trimesoil são os compostos mais comumente utilizados na formação de poliamidas pela polimerização interfacial, dando origem a polímeros aromáticos.

um suporte ultrafiltrante composto por poliacrilonitrila, o qual resulta na formação de uma rede de poliamidas aromáticas, altamente reticulada (Ghosh et al, 2011; Gu et al, 2013). Outros materiais para confecção de membranas compósitas de fina camada estão disponíveis no mercado, alguns deles são apresentados na tabela 1:

Tabela 1 Detalhes das diferentes membranas de osmose inversa disponíveis no mercado (Ghosh et al, 2011).

Membranas OI	Material	Condições de teste (Pressão e solução de alimentação)	Fluxo do permeado (m ³ m ⁻² dia ⁻¹)	Rejeição de sal (%)
NS-200	Polifurano sulfonado	> 100 bar, 3.5% NaCl	0.8	99,8
PES-1000	Polifurano poli éter	> 69 bar, 3.5% NaCl	0,5	99,9
CP	Polissulfona sulfonada	> 69 bar, 3.5% NaCl	0,06	98
NS-100	Poliamida (alifático- aromático)	> 100 bar, 3.5% NaCl	0,7	99
PA-300/RC- 100	Poliamida (via poliepiamina)	> 69 bar, 3.5% NaCl	1	99,4
NS-300	Polipiperazina-amida	> 100 bar, 3.5% NaCl	3,3	68
FT-30	Poliamida aromática	> 15 bar, 0.2% NaCl	1	99
UTC series	Poliamida aromática	> 15 bar, 0.5% NaCl	0,8	98,5
BARC-TFC1	Poliamida (alifático- aromática)	10 bar, 0.2% NaCl	0,45	92
BARC-TFC2	Poliamida aromática	10 bar, 0.2% NaCl	0,55	97

Vários métodos estão disponíveis para caracterizar molecular e morfologicamente as membranas de OI, e outros vem sendo desenvolvidos nos últimos anos visando um melhor entendimento nos níveis molecular, microcristalino e coloidal de membranas poliméricas. Métodos bem estabelecidos incluem a estimativa do peso molecular de corte, o transporte de bolhas de gás, a medição do fluxo de água e de rejeição de soluto, a porosimetria de mercúrio, equilíbrio vapor líquido, equilíbrio gás-líquido, porometria de permeabilidade, equilíbrio sólido líquido, porometria térmica e métodos microscópicos. Os principais métodos são:

- A estimativa do peso molecular de corte é um atributo do diâmetro do poro da membrana e está relacionada à rejeição de solutos esféricos de um determinado peso molecular. É o método mais aproximado da rejeição real da membrana, devido principalmente às interações de carga entre a membrana e o soluto.
- Métodos baseados na medida de pressão e transporte de bolhas de gás são utilizados para mensurar a integridade e distribuição dos poros ao longo da

membrana, como são realizadas sob condições de umidade, os danos são minimizados.

- A porometria de permeabilidade é baseada na condensação por capilaridade de líquidos em microporos, o que possibilita o bloqueio de poros de tamanhos específicos pela regulação da pressão relativa. Com a redução da pressão os poros com tamanhos correspondentes à pressão de vapor são esvaziados e se mantem disponíveis para o transporte de gás (Malaeb & Ayoub, 2011).
- Diversas técnicas de microscopia são utilizadas no estudo de membranas, as mais utilizadas são a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a microscopia de força atômica (MFA), que permitem a visualização e análise da morfologia da membrana e da camada incrustante. Outras microscopias vêm sendo utilizadas com sucesso, como a microscopia eletrônica de varredura ambiental (MEVA), que não necessita de cobertura com ouro ou carbono, como a MEV tradicional, e a microscopia eletrônica de varredura de campo (MEVC), a qual fornece dados qualitativos sobre a rugosidade e deposição de incrustantes na superfície da membrana (Malaeb & Ayoub, 2011).

Várias abordagens estão sendo utilizadas no desenvolvimento de membranas, entre elas a funcionalização das camadas de poliamida com moléculas que conferem propriedades especiais. Essas moléculas variam desde a inserção de nanotubos de carbono (NTC), os quais demonstraram aumentar o fluxo de água e a estabilidade da membrana quando misturados ao *m*-fenilenodiamina durante o processo de polimerização (Kim et al, 2014). Outra modificação que visa o aumento na vida útil das membranas é a funcionalização com nanopartículas de prata, um biocida extremamente eficaz no controle do biofilme, entretanto devido ao alto custo, as partículas de prata estão sendo substituídas por partículas de cobre, o que reduz o custo total em 99%. As nanopartículas de cobre podem ser acopladas ao polication polietilenamina, o qual irá interagir com as cargas negativas presentes na superfície da membrana. Os resultados encontrados demonstraram uma redução variando entre 66-99% no número de bactérias viáveis aderidas, tanto para Gram positivas quanto para Gram negativas (Ben-Sasson et al, 2014). Outra abordagem que vem sendo utilizada com grande sucesso é a formação da membrana pela técnica de deposição molecular de camada por camada (mLbL – do inglês *molecular layer-by-layer deposition*), na qual a camada suporte composta por poliácridonitrila é coberta por uma bicamada intermediária de polieletrólitos (camada

por camada – LbL), consistindo de uma camada de polietilenoimina (PEI) carregada positivamente e outra de poliácido acrílico (PAA). A grande quantidade de grupos carboxílicos na camada de PAA facilita as ligações de hidrogênio com a primeira deposição de *m*-fenilenodiamina, que juntamente com o cloreto de trimesoil irão formar a camada de poliamida (PA). Esta técnica de polimerização aumentou em 75% o fluxo de água pela membrana, mantendo >98% de retenção de sais, quando comparada com membranas de PA sintetizadas por polimerização interfacial tradicional (Gu et al, 2013). Outra abordagem interessante é o uso do amino ácido 3 (3,4-dihidroxifenil) L – alanina para criar uma superfície zwitteriônica, possibilitando uma redução na incrustação e um aumento no fluxo de água devido ao aumento na hidrofiliabilidade da superfície da membrana (Azari & Zou, 2012). A redução na incrustação se deve principalmente pelo aumento na energia de interação ácido-base, o que diminui a afinidade de compostos incrustantes com a membrana (Azari et al, 2014).

A incrustação biológica ou biofilme ainda é o principal desafio na tecnologia de dessalinização por membranas. As dificuldades se encontram principalmente na capacidade das bactérias de formarem biofilme mesmo sob condições extremas e à sensibilidade das membranas aos biocidas mais baratos, como os biocidas à base de cloro (Ben-Sasson et al, 2014; Kim et al, 2014).

Vários estudos vêm sendo realizados com o objetivo de avaliar o uso de bacteriófagos no controle, seja pela prevenção ou na degradação de biofilmes bacterianos já formados. Em alguns casos reduções superiores a 90% são encontrados, tanto por bacteriófagos isolados no ambiente quanto por bacteriófagos modificados por engenheirados (Chibeu et al, 2012; Hughes et al, 1998b; Lu & Collins, 2007). Lu and Collins (2007) obtiveram reduções acima de 99%, utilizando bacteriófagos contendo o gene para a enzima Dispersina B integrado em seu genoma, sendo expresso constitutivamente na forma solúvel.

2.2 Biofilme

As bactérias estão presentes no ambiente sob duas formas, sésseis ou planctônicas. Na forma sésstil, as células encontram-se aderidas formando comunidades densas em multicelulares chamadas biofilmes, enquanto na forma planctônica encontram-se livres e individualizadas (Donlan & Costerton, 2002). Biofilmes são encontrados nos mais diversos sistemas, orgânicos ou inorgânicos, em ambientes naturais ou artificiais,

são observados em indústrias e hospitais. São utilizados em alguns processos industriais, como: tratamento de efluentes, produção de biocombustíveis, biorremediação e produção de aditivos para aplicações químicas e alimentícias, entretanto, em ambientes de processamento de alimentos, a formação de biofilme pode representar uma fonte de contaminação, enquanto na indústria pode causar biocorrosão, contaminação de produtos, impedimento mecânico e de transferência de calor (Coetser & Cloete, 2005; da Silva & De Martinis, 2013). Neste último tem causado sérios problemas, devido ao aumento de até mil vezes na resistência dos micro-organismos à biocidas (Cornelissen et al, 2011).

O biofilme é um complexo ecossistema microbiano, no qual estão incluídos fungos, bactérias e protozoários associados, fixados às superfícies bióticas ou abióticas, envoltos em uma matriz extracelular, composta por substâncias poliméricas e nutrientes capturados para a formação da matriz (Cornelissen et al, 2011; Sutherland et al, 2004). Esta característica lhes confere a capacidade de se estabelecer em variados locais e em inóspitas condições nutricionais, além de facilitar a comunicação intercelular através de moléculas sinalizadoras (Sutherland et al, 2004). Os biofilmes são tipicamente constituídos por água, micro-organismos, exopolissacarídeos (EPS), partículas retidas e substâncias dissolvidas e adsorvidas (Cornelissen et al, 2011; Pereira, 2001). A água constitui a parte mais significativa da massa total do biofilme, com a contribuição variando entre 70 a 97% da massa total (Sutherland et al, 2004) e os micro-organismos são somente uma pequena parte da massa e do volume de um biofilme (menos de 10%), embora excretem as substâncias poliméricas que representam a fração dominante da matéria orgânica seca do biofilme (Pereira, 2001).

O processo de formação de biofilme compreende em diferentes estágios. O primeiro deles consiste da pré-adesão, na qual os micro-organismos planctônicos recebem o estímulo que os leva a aderir à superfície. Alguns fatores podem influenciar esse processo, tais como o pH, concentração e biodisponibilidade de nutrientes, presença de autoindutores do *quórum sensing*, compostos orgânicos, inorgânicos e a temperatura (Forsythe, 2013). Em seguida ocorre o estágio de adesão reversível, onde há a interação célula-superfície e sua colonização inicial. O processo de adesão bem sucedido depende de alguns fatores, como o aparato celular do micro-organismo e as características da superfície da bactéria e do substrato. Esta adesão é considerada

reversível, pois é possível observar o retorno de células aderidas ao seu estado planctônico (Boari et al, 2009).

A próxima etapa compreende a adesão irreversível, que ocorre, aproximadamente, duas horas após a adesão inicial e se caracteriza pela presença de microcolônias, que correspondem a um amontoado de células aderidas entre si e a uma superfície. Neste instante, a motilidade cessa e genes envolvidos na comunicação célula-célula (*quórum sensing*) e na produção de EPS estão totalmente ativos (Boari et al, 2009). O quarto estágio é o de maturação. Ela garante uma maior estabilidade e é correspondente à maturação da estrutura que já vem sendo formada. Ocorre de três a seis dias após a adesão inicial, podendo chegar a 10 dias. A maturidade acontece, por meio do aumento da densidade populacional e, também, pela produção e deposição de EPS, aumentando com isso a espessura do biofilme e a estabilidade da colônia contra flutuações do ambiente. O aumento da população de um biofilme acontece tanto pela divisão celular, quanto pela redistribuição de células entre as microcolônias e pela adesão de novas células planctônicas. Por fim, ocorre o destacamento de células. Acontece entre 9 a 12 dias depois dos processos iniciais. As células se apresentam móveis e assemelham-se às células planctônicas, podendo formar um novo biofilme na linha de produção (Forsythe, 2013)(Figura 2).

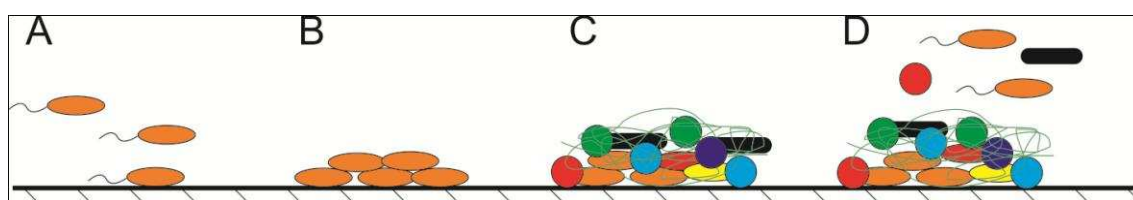


Figura 2 Esquema ilustrando as diferentes fases do processo de formação do biofilme. A-Pré-adesão e adesão reversível; B -adesão irreversível; C - maturação; D - destacamento e células prontas para colonização de outra superfície ou ambiente.

As bactérias presentes no biofilme são diferentes das de livre flutuação (planctônicas), devido às mudanças metabólicas e fisiológicas necessárias para a passagem do estado livre para o de crescimento em biofilme, o que evidencia a existência de genes reguladores do processo (Davies et al, 1998). De fato, muitas espécies de bactérias regulam a expressão de genes em resposta ao aumento da densidade de células da população, fenômeno denominado *quórum sensing*, que

envolve moléculas de sinalização e regulação da expressão gênica, denominadas autoindutores (Keller & Surette, 2006).

Com a emergência de linhagens resistentes aos antibióticos e às falhas na remoção, por meio de métodos químicos, do biofilme estabelecido (Bereschenko et al, 2011; Cornelissen et al, 2011), surge a necessidade de buscar novas classes de agentes antimicrobianos.

As diversas estratégias para prevenir e controlar a formação de biofilme em sistemas de OR são alvos de pesquisas nas últimas duas décadas, principalmente no processo de polimerização e na estrutura química do polímero, seja pela modificação dos monômeros constituintes ou pela inserção de moléculas com propriedades de interesse, como nanopartículas, íons, entre outros (Azari et al, 2014; Ben-Sasson et al, 2014; Kang & Cao, 2012). Dentre as diversas abordagens no controle de biofilmes por substâncias bactericidas, a fagoterapia, que consiste no uso de bacteriófagos no controle bacteriano, vem se apresentando como uma estratégia antimicrobiana. Esta metodologia ainda apresenta algumas vantagens adicionais, como a replicação *in situ*, a especificidade de hospedeiros e a presença, em alguns fagos, de depolimerases que possibilitam a destruição da parede bacteriana e dos exopolissacarídeos presentes (Bayer et al, 1979; Clark & March, 2006; Cornelissen et al, 2011). O uso dos fagos tem sido visto como uma alternativa limpa e promissora no controle de biofilmes nos mais diversos ambientes (Belgini et al, 2014; Donlan, 2009; Fu et al, 2010; Goldman et al, 2009; Simões et al, 2010). Entretanto, devido às dificuldades encontradas no desenvolvimento de métodos realmente eficazes, capazes de inibir o crescimento de biofilme nos sistemas de OR (Malaeb et al, 2013), e à necessidade de estudos mais aprofundados com relação aos efeitos dos fagos sobre o biofilme (Sutherland et al, 2004),

2.3 Bacteriófagos

Bacteriófagos são amplamente distribuídos e exibem dramáticas manifestações na ecologia bacteriana, tanto em meio líquido quanto em meio sólido. Surpreende terem sido descobertos somente 40 anos após o início da bacteriologia, ainda nos anos de 1880. Alguns pesquisadores já sugeriam a presença de bacteriófagos, no entanto estes estudos não davam suporte suficiente para pesquisas futuras (Waldor et al, 2005).

Alguns trabalhos relatam as observações feitas pelo químico inglês Ernest Hankin, no final do século XIX, em que as águas dos rios Jumna e Ganges teriam a capacidade de matar alguns tipos de bactérias, especialmente do *Vibrio cholerae*. Ele mostrou que essa capacidade asséptica era filtrável e sensível à fervura, o que o levou a crer que se tratava de uma substância química volátil (Waldor et al, 2005), entretanto, foi demonstrado se tratar de alguma substância química volátil capaz de matar determinados micro-organismos (Abedon et al, 2011).

Em 1901 Emmerich e Löw descreveram uma substância presente em culturas autolisadas que tinha a capacidade de causar lise de diversas outras culturas, possuía efeito curativo em infecções experimentais e provia imunidade profilática a inoculações subsequentes (Emmerich & Löw, 1901). Estes experimentos iniciais foram limitados a observações em culturas líquidas já que no início da bacteriologia as culturas eram conceitualizadas como um organismo em si e não como uma população dinâmica de células individuais. Os primeiros e mais claros experimentos usaram a dispersão de culturas em meio sólido e se basearam na observação de bacteriolise, isto é placas de lise (Waldor et al, 2005).

Frederick W. Twort publicou artigo em 1915, em que notou o crescimento de algumas colônias contaminantes de *Micrococcus*, e que algumas possuíam aparência mucóide, aquosas ou vítreas. Ele interpretou esses resultados como sendo algo semelhante a uma doença infecciosa aguda de micrococcus (Twort, 1915). Independentemente, em 1917 Félix d'Herelle descreve um "micróbio" antagonista às bactérias, lisando-as em culturas líquidas e formando manchas discretas, as quais ele chamou de placas, na superfície de ágar com bactérias semeadas. Pensando se tratar de ultra-virus que invadem bactérias e multiplicam com perdas ao hospedeiro, ele os chamou de bacteriófagos (d'Herelle, 1917).

Algumas das mais importantes descobertas na genética vieram de estudos com bacteriófagos, ou resumidamente fagos. Os fagos são organismos parasitas de vida intracelular obrigatória, incapazes de se multiplicar fora das células bacterianas. Possuem material genético composto por DNA (fita simples ou dupla) ou RNA (fita simples ou dupla, polaridade positiva ou negativa), envolto em uma capa proteica e/ou uma membrana lipídica. Ao encontrar uma célula bacteriana susceptível, inserem seu material genético, que ao entrar direcionam a maquinaria celular no sentido de produzir

mais fagos. Podem ser considerados haploides, uma vez que carregam apenas uma cópia de cada gene. Essa característica torna o isolamento de um fago mutante relativamente fácil, já que todos os mutantes irão apresentar o fenótipo desejado, sem que haja a necessidade de cruzamentos (Snyder & Champness, 2007).

Logo após sua descoberta, os fagos foram usados no controle de patógenos bacterianos (Levin & Bull, 1996; Weinbauer, 2004). Entretanto, a fagoterapia foi abandonada no ocidente, devido principalmente a resultados ambíguos e a descoberta dos antibióticos. Em alguns países da Europa Oriental e os que formavam a União Soviética a fagoterapia continuou a ser utilizada (Weinbauer, 2004). A ameaça de resistência aos antibióticos fez com que houvesse um maior interesse pela fagoterapia (Merril et al, 1996). Agências reguladoras dos Estados Unidos, como a US Food and Drug Administration (FDA), US Environmental Protection Agency (EPA) e United States Department of Agriculture (USDA) já têm aprovado produtos baseados em fagos, favorecendo seu uso em diversas indústrias, como de alimentos, na agricultura, e no diagnóstico clínico. Estes produtos apresentam precedentes favoráveis, pois é possível adaptar componentes individuais do coquetel fágico para alvos específicos (Lu & Collins, 2007; Lu & Koeris, 2011). Vários passos durante o ciclo de vida dos fagos são comuns a todos os vírus: adsorção, liberação do ácido nucléico do capsídeo, expressão e replicação, montagem, liberação e transmissão (Duckworth, 1987). A adsorção dos bacteriófagos ocorre em duas etapas. Na primeira, a adsorção ocorre pela interação com uma estrutura definida na superfície celular (após um contato inicial) e é reversível, podendo ainda o fago decidir por não infectar a célula. Durante a segunda etapa, uma ligação irreversível ocorre entre a estrutura fágica (por exemplo, fibras da cauda) e o receptor bacteriano. Após a adsorção, a parede celular é permeabilizada (pelo uso de enzimas presentes na cauda ou capsídeo, por exemplo) possibilitando a inserção do material genético viral, enquanto o capsídeo permanece fora da célula. Após a inoculação do genoma, este pode seguir por dois caminhos, ser integrado ao genoma do hospedeiro ou permanecer no citoplasma. Para todos os diferentes vírus, este é um estágio onde o genoma do fago existe dentro do hospedeiro, mas não integrado ao seu genoma. A expressão gênica, replicação do genoma e morfogênese ocorrem, isto é, a formação de genomas e o seu empacotamento nos capsídeos (Weinbauer, 2004). O período de latência é a fase da infecção onde não há fagos livres ou extracelulares detectáveis e descreve a fase do ciclo que varia da adsorção à lise celular. O período

anterior a montagem dos capsídeos e inclusão dos genomas é conhecido como período de eclipse. O período de crescimento é caracterizado pela liberação de fagos maduros para o meio ambiente, devido à lise celular e à detecção de fagos livres (virions), sendo o número de virions liberados por célula para o meio chamado de “*burstsize*” (Carvalho et al, 2010).

Fagos caudados causam a lise celular por um sistema duplo de lise, constituído por hidrolases de peptideoglicanos (endolisinas), que atacam a mureína presente na parede celular, e holinas, que danificam a membrana plasmática e permitem que as endolisinas tenham acesso ao peptideoglicano (Ackermann, 1998). Podem também ser liberados por brotamento ou extrusão. O estágio extracelular termina com a inviabilidade do fago ou uma nova infecção. Os fagos mostram vários ciclos de vida: lítico, lisogênico, pseudolisogênico e infecções crônicas (Weinbauer, 2004).

No ciclo lítico, os fagos (líticos ou virulentos) direcionam a maquinaria do hospedeiro para a produção de novos fagos, os quais são liberados pela lise celular. O ciclo lisogênico se caracteriza pela manutenção do genoma (lisogênico ou temperado) em um estado de dormência (profago), em que ele replica juntamente com o genoma do hospedeiro, até que o ciclo lítico seja induzido. A decisão lisogênica dos fagos temperados, pelo estabelecimento do profago ou não, acontece após a introdução do material genético no interior celular. Infecções crônicas ocorrem quando uma é célula infectada e a progênie viral é constantemente liberada por brotamento ou extrusão. Em infecções persistentes (Pseudolisogenia, estado de carreador), fagos multiplicam em uma fração da população. Pseudolisogenia e estado de carreador são amplamente usados como sinônimos, no entanto estado de carreador é mais estritamente utilizado para bactérias contendo profago na forma de plasmídeo (Ackermann & DuBow, 1987; Weinbauer, 2004). Entretanto, tais classificações são provavelmente uma simplificação da diversidade de ciclos de vida dos bacteriófagos (Lenski, 1988)(Figura 3).

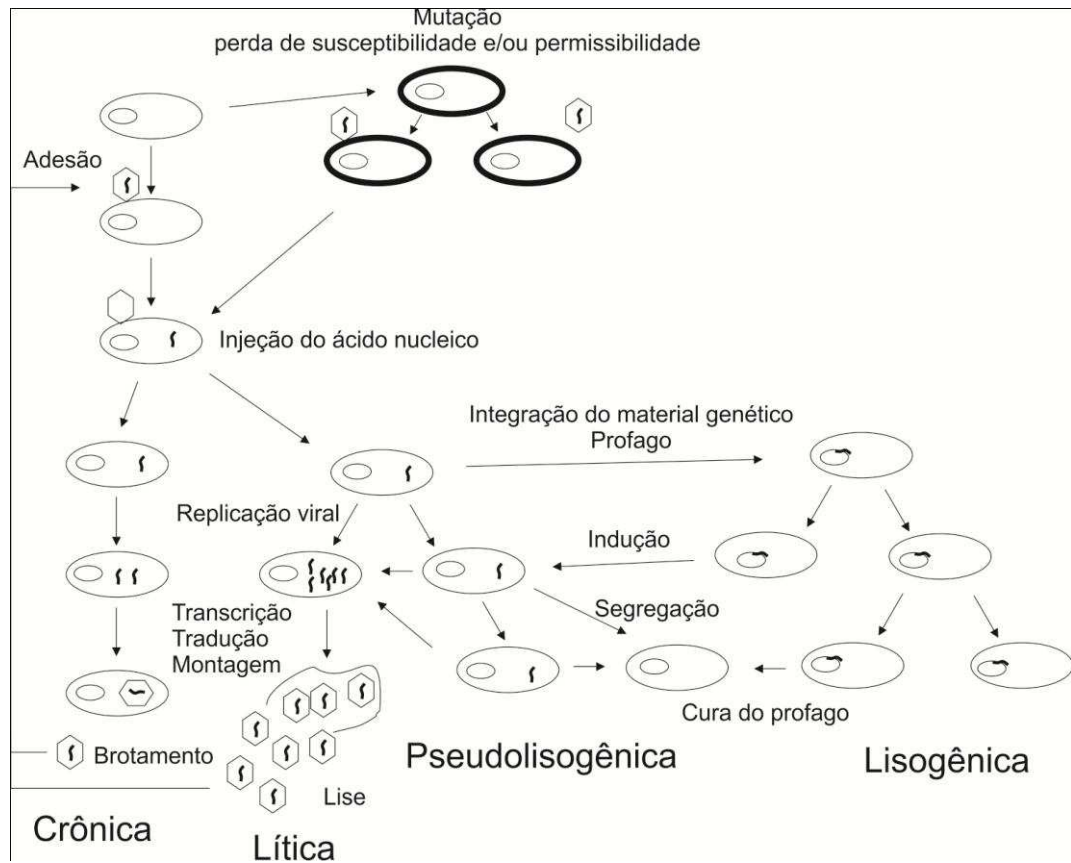


Figura 3 Esquema ilustrando os ciclos de vida dos bacteriófagos: 1 - crônica, onde os virions são liberados por brotamento; 2 - lítica, ocorre lise celular; 3 - pseudolisogêncica, o material genético se mantém quiescente no citoplasma celular e 4 - lisogênica, o material genético viral é integrado ao genoma bacteriano. Adaptado de (Weinbauer, 2004).

A observação de que 96% dos fagos isolados de procariontes são caudados (Ackermann, 1996) sugere que a maioria dos vírus pertence ao grupo monofilético de fagos caudados (ordem *Caudovirales*). Possuem DNA de fita dupla como material genético e são divididos em três famílias, de acordo com características bioquímicas e moleculares da cauda (Ackermann, 1998), como observado na figura 4.

A origem dos fagos caudados ocorreu antes da separação dos organismos em três domínios Bacteria, Archaea e Eukarya, tendo provavelmente cerca de 3,5-3,7 bilhões de anos. Têm sido relatados para Eubacteria e Archaea, considerando sua presença para células do domínio Eukarya uma dúvida (Ackermann, 1998; Hendrix et al, 1999). A ordem *Caudovirales* se divide em três famílias, dividida de acordo com a característica da cauda: fagos com uma cauda longa e flexível (*Siphoviridae*), fagos com cauda contrátil (*Myoviridae*) e fagos com cauda curta (*Podoviridae*) (Weinbauer, 2004). Outras morfologias encontradas nos bacteriófagos, além de caudados, são: poliédricos, pleomórficos e filamentosos (Figura 5) (Dias et al, 2013b).

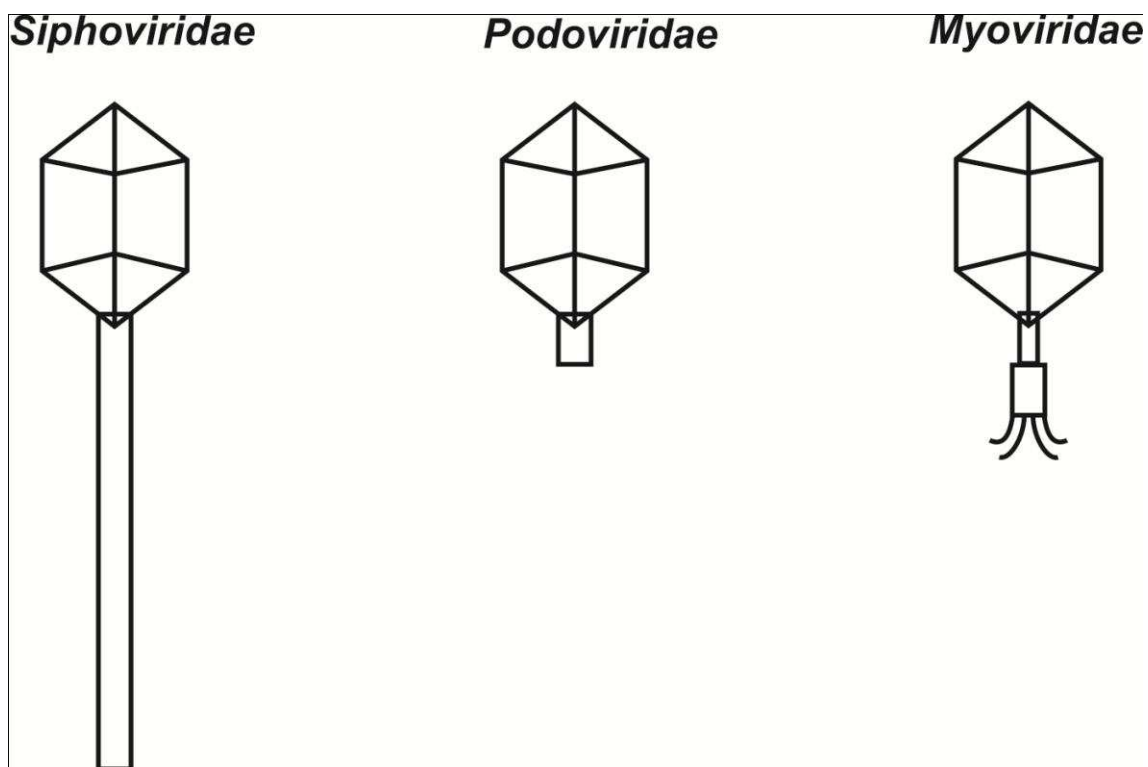


Figura 4 Representações esquemáticas das três famílias constituintes da ordem Caudovirales, as quais compreendem 96% dos bacteriófagos isolados.

O último levantamento feito por Ackermann and Prangishvili (2012) mostrou haver estudos morfológicos de cerca de 6300 vírus capazes de infectar procariotos, distribuídos em uma ordem (*Caudovirales*) contendo três famílias e outras sete famílias não agrupadas em qualquer ordem, o que torna esse grupo viral o mais abundante. Os vírus que infectam bactérias, fagos, são os mais abundantes, compreendendo 98% de todos os vírus de procariotos, os quais podem infectar 163 gêneros bacterianos, entre eles os hospedeiros mais predominantes são: *Streptomyces*, *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Lactococcus*, *Pseudomonas* e *Vibrio*.

Diante de toda essa diversidade, vários estudos utilizando fagos no controle de micro-organismos e biofilmes estão sendo desenvolvidos, o que demonstra uma renovação no interesse da comunidade científica pelos bacteriófagos (Chibeu et al, 2012; Cornelissen et al, 2011; Hoe et al, 2013). Recentemente várias abordagens são avaliadas no uso de bacteriófagos, desde o seu uso diretamente sobre o biofilme, tanto pela ação lítica sobre o hospedeiro ou pela ação de depolimerases no biofilme formado (Belgini et al, 2014; Chibeu et al, 2012; Hughes et al, 1998a), a inserção por técnicas de engenharia genética de enzimas de interesse, sejam depolimerases (por exemplo,

Dispersina B) ou enzimas responsáveis pela regulação do *quórum sensing*, via degradação de moléculas indutoras (Lu & Collins, 2007; Pei & Lamas-Samanamud, 2014).

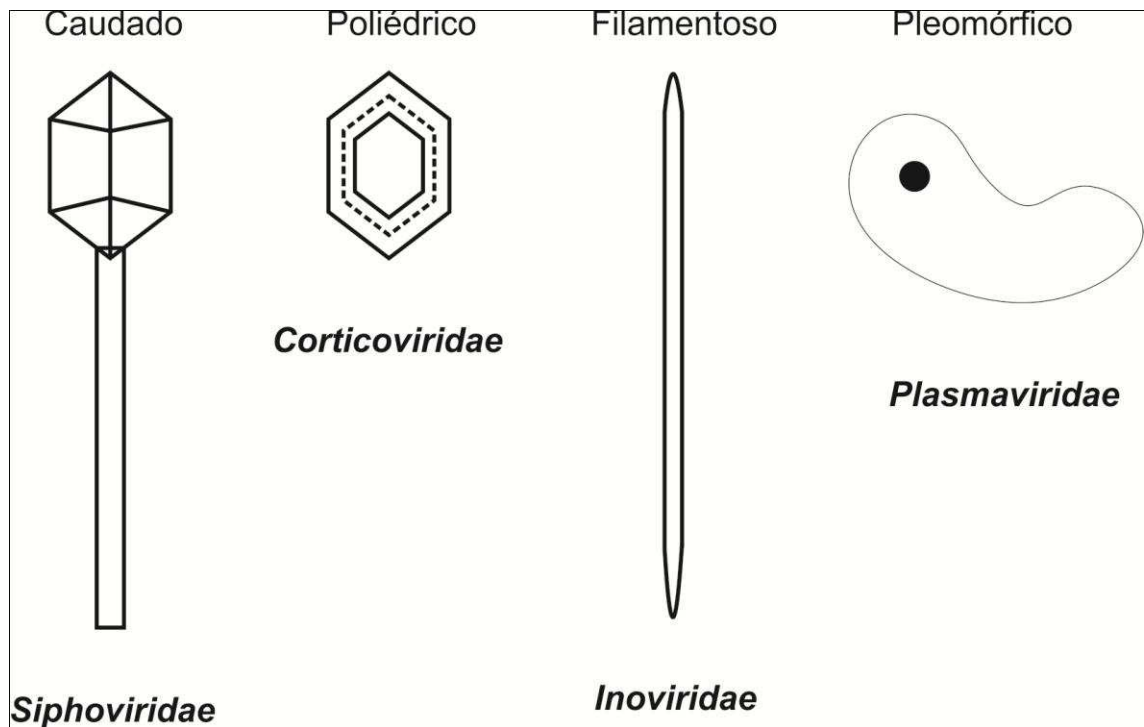


Figura 5 Morfologias encontradas entre os diferentes bacteriófagos. São apresentados fagos com genoma composto por DNA de dupla fita (famílias *Siphoviridae* e *Corticoviridae*), DNA de fita simples família (*Inoviridae*) e RNA de fita simples (*Plasmaviridae*) (Dias et al, 2013b).

O'Flaherty et al (2009) listaram as principais vantagens e desvantagens do uso de fagos. Dentre as vantagens pode-se destacar: (1) fácil isolamento e propagação; (2) capacidade de causar lise à patógenos resistentes; (3) atuação sinérgica em coquetéis fágicos ou em combinação com antibióticos; (4) ação sobre micro-organismos gram-positivos e gram-negativos; (5) aplicação em diversos ambientes (humanos, animais, alimentos, biofilmes, dispositivos médicos, entre outros); (6) fácil manipulação genética; (7) alta especificidade; (8) método profilático ou para tratamento e (9) certificado de segurança de alguns produtos pela FDA. Dentre as desvantagens foram listados: (1) necessidade de selecionar fagos sem genes de virulência e não-lisogênicos; (2) surgimento de cepas bacterianas resistentes; (3) gama limitada de hospedeiros e (4) necessidade de aceitação dos consumidores e regulação específica.

Diante dos problemas encontrados no controle do biofilme pelas técnicas comumente utilizadas e das vantagens no uso dos bacteriófagos, estes surgem como um

alternativa viável e promissora no controle de micro-organismos e do biofilme associado em escalas industriais.

3 Objetivos

3.1 Objetivos gerais

- Avaliar o potencial de bacteriófagos no controle de biofilme formado por bactérias isoladas a partir da água de alimentação de sistemas de osmose inversa de refinarias de petróleo.

3.2 Objetivos específicos

- Isolar e caracterizar fagos, molecular e morfológicamente, contra as bactérias isoladas em águas de alimentação de sistemas de osmose inversa em refinarias de petróleo.
- Avaliar sua capacidade na redução da formação de biofilme pelas bactérias presentes na água de alimentação.
- Avaliar a utilização de dois sistemas nos ensaios de biocontrole do biofilme por fagos.
- Caracterizar o biofilme formado na superfície de membranas de osmose inversa com relação a estrutura e a viabilidade celular ao longo do processo de formação do biofilme.

4 Metodologia

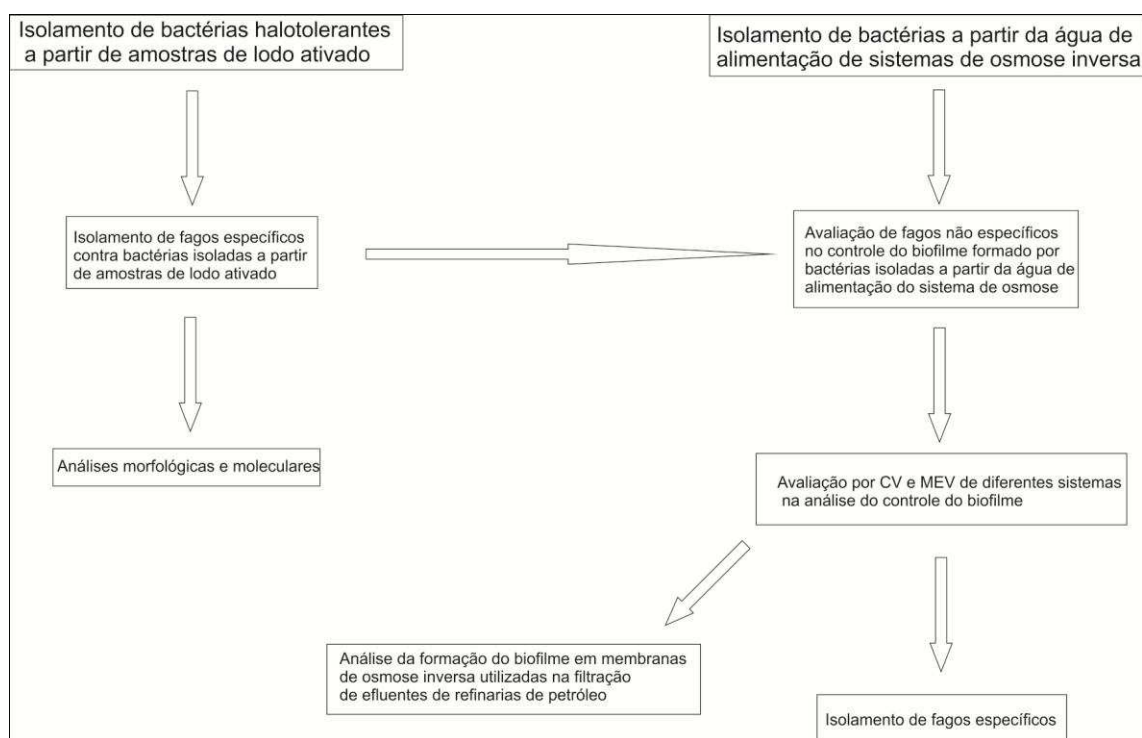


Figura 6 Fluxograma apresentando a sequência de atividades realizadas nesse trabalho.

4.1 Linhagens bacterianas

As linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho, nos ensaios de formação e controle do biofilme por bacteriófagos, foram isoladas e identificadas a partir de águas de alimentação de sistemas de osmose inversa, provenientes da Refinaria Gabriel Passos (REGAP), Betim, MG, Brasil. Os isolados foram identificados de acordo com a amostra de água de alimentação, água de alimentação 1 (A01) e a ordem de isolamento, de 01 a 33. As bactérias isoladas foram classificadas em cinco principais grupos taxonômicos: Actinobacteria, Bacteroidetes, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria e Gammaproteobacteria (Tabela 2). Os isolados foram gentilmente cedidos pela Dr^a Valéria Maia de Oliveira, do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP), Campinas, SP, Brasil.

4.2 Isolamento bacteriano a partir de amostras de lodo ativado

As bactérias utilizadas no isolamento de bacteriófagos foram obtidas a partir de amostras de lodo ativado coletado na REGAP, utilizando os meios de cultura: Caldo Nutrientes Salino modificado (Mod) (17,8 g de NaCl; 0,1 g de MgSO₄.7H₂O; 0,036 g de

CaCl₂.2H₂O; 0,2 g de KCl; 0,006 g de NaHCO₃; 0,023 g de NaBr; traços de FeCl₃.6H₂O; 0,5 g de peptona-protease; 1,0 g de extrato de levedura; 0,1 g de glicose e água suficiente para 1 litro, pH ajustado para 7,2), e R2A (0,5 g de extrato de levedura; 0,5 g de peptona-protease; 0,5 g de ácido casamínico; 0,5 g de glicose; 0,5 g de amido solúvel; 0,3 g de K₂HPO₄; 0,05 g de MgSO₄.7H₂O; 0,3 g de piruvato de sódio; 15 g de ágar e água suficiente para 1 litro, pH ajustado para 7,2). No isolamento, amostras de 10 g de lodo ativado provenientes da REGAP foram diluídas em 100 mL de tampão fosfato (PBS) (5,2 g de NaH₂PO₄; 23 g de Na₂HPO₄; água suficiente para 1 litro, pH ajustado para 7,4). A partir dessa suspensão foram retiradas alíquotas de 1 mL e submetidas à diluição seriada e plaqueamento, nos dois meios descritos, a fim de obter placas com colônias isoladas. Quatro colônias bacterianas, morfologicamente distintas foram selecionadas em cada meio de cultura. Os isolados foram identificados de acordo com o meio de cultivo e a ordem de isolamento, sendo M (Mod) e R (R2A) seguido pelo número referente à ordem de isolamento. Estes meios de cultura foram selecionados visando mimetizar as concentrações salinas encontradas no sistema de OR, uma vez que as bactérias que formam biofilmes em sistemas de OR estão em contato com o concentrado, retido pela membrana. Estas bactérias foram então utilizadas no isolamento de fagos.

Tabela 2 Lista de bactérias utilizadas nos ensaios de formação e controle do biofilme por fagos. São apresentados os códigos - CD, a identificação (gênero ou espécie) - ID e o grupo taxonômico - GT de cada isolado bacteriano.

CD	ID	GT	CD	ID	GT
A01-01	<i>Mycobacterium</i> sp.	Actinobacteria	A01-19	<i>Doknodellasp.</i>	Gammaproteobactéria
A01-02	<i>Acidovorax soli</i>	Betaproteobactéria	A01-20	<i>Azospirillum</i> sp.	Alphaproteobactéria
A01-04	<i>Mycobacterium</i> sp.	Actinobacteria	A01-21	<i>Brevundimonassp.</i>	Alphaproteobactéria
A01-05	<i>Gordoniasp.</i>	Actinobacteria	A01-22	<i>Lysobacterbrunescens</i>	Gammaproteobactéria
A01-06	<i>Flavobacteriasp.</i>	Bacteroidetes	A01-23	<i>Mycobacterium</i> sp.	Actinobacteria
A01-07	<i>Pseudomonassp.</i>	Gammaproteobactéria	A01-25	<i>Pseudomonassp.</i>	Gammaproteobactéria
A01-08	<i>Diaphorobacternitroreducens</i>	Betaproteobactéria	A01-26	<i>Brevundimonassp.</i>	Alphaproteobactéria
A01-10	<i>Sphingomonas xenofaga</i>	Alphaproteobactéria	A01-27	<i>Pseudomonassp.</i>	Gammaproteobactéria
A01-12	<i>Nocardioide</i> sp.	Actinobacteria	A01-28	<i>Agrobacteriumtumefaciens</i>	Alphaproteobactéria
A01-13	<i>Lysobacterbrunescens</i>	Gammaproteobactéria	A01-29	<i>Boseaeneae</i>	Alphaproteobactéria
A01-14	<i>Sphingopyxis soli</i>	Alphaproteobactéria	A01-30	<i>Brevundimonassp.</i>	Alphaproteobactéria
A01-15	<i>Boseaeneae</i>	Alphaproteobactéria	A01-31	<i>Burkholderiasp.</i>	Betaproteobactéria
A01-16	<i>Azospirillum</i> sp.	Alphaproteobactéria	A01-32	<i>Novosphingobiumnitrogenifigens</i>	Alphaproteobactéria
A01-17	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	Gammaproteobactéria	A01-33	<i>Brevundimonassp.</i>	Alphaproteobactéria
A01-18	<i>Flavobacterium</i> sp.	Bacteroidetes	A01-34	<i>Sphingomonas xenophaga</i>	Alphaproteobactéria

4.3 Identificação bacteriana

Os isolados obtidos foram identificados pela amplificação e sequenciamento do rRNA 16S, as sequências obtidas foram submetidas a bancos de dados para verificação da homologia com sequências depositadas.

O DNA bacteriano foi obtido pela técnica descrita por Pospiech and Neumann (1995), com modificações. Brevemente, 5 mL de suspensão bacteriana na densidade óptica (DO_{600}) igual a 0,7 foi centrifugada a 4000xg por 20 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado suspenso em 500 microlitros de tampão SET (20 mM Tris, NaCl 75mM, EDTA 25 mM). À suspensão bacteriana em meio SET foi adicionada lisozima na concentração final de 1 mg/mL e incubada a 37 °C por 30 minutos. Após o período de incubação foram adicionados SDS e proteinase K nas concentrações finais de 1% e 0,5mg/mL, respectivamente, e incubados novamente por 1 hora a 55°C. Após este período foram adicionados à suspensão bacteriana NaCl na concentração final de 1M e igual volume de clorofórmio, homogeneizado por 30 minutos à temperatura ambiente e então centrifugado por 10 minutos a 4.000xg. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL e a ele adicionado igual volume de isopropanol. A mistura foi incubada por 2 horas a -20 °C e após este tempo centrifugado por 10 minutos a 11.000xg. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado 2x com etanol 70% gelado. O DNA foi suspenso em água destilada e deionizada, quantificado e utilizado nas reações de PCR (reação em cadeia da polimerase) como descrito por Weisburg et al (1991).

4.4 Isolamento de bacteriófagos

Os fagos foram isolados seguindo o protocolo descrito por Tanji et al (2008), com algumas modificações. Foi obtida uma suspensão do concentrado de lodos ativados pela diluição em água 10% (v/v), suplementada com o mesmo volume de caldo nutriente. Esta suspensão foi mantida a 37 °C durante 24 horas para o enriquecimento de fagos e após o período de incubação, centrifugada a 4.000xg durante 10 minutos, visando a precipitação de partículas de maiores dimensões. Ao sobrenadante foi adicionado clorofórmio na proporção de 10% (v/v) e NaCl a concentração final de 1 M. O volume total foi incubado durante 1 h a 4 °C, sob agitação e centrifugado a 4000xg durante 20 minutos. A fase aquosa foi transferida para outro tubo e a ela adicionada polietilenoglicol 8.000 (PEG-8000) na concentração de 10% (p/v). A solução foi incubada a 4 °C durante 24 horas e após esse período, centrifugada a 11.000xg durante

20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado suspenso em tampão SM (5,8 g de NaCl , 2 g de MgSO₂.7H₂O , 50 ml de Tris-HCl 1M, pH ajustado para 7,5 , 5 mL de gelatina 2% (p/v), H₂O para volume final de 1000 mL). O PEG foi removido usando igual volume de clorofórmio. A fase aquosa foi separada por centrifugação a 4000xg durante 20 minutos e utilizada como estoque para o isolamento de fagos.

A triagem e titulação de fagos líticos foram realizadas pelo método de dupla camada em ágar (Sambrook & Russell, 2001), utilizando as oito bactérias isoladas a partir do lodo ativado em meios Mod e R2A. As placas foram incubadas a 30 °C e as placas de lise formadas na camada superior foram isoladas e amplificadas.

Fagos específicos foram isolados utilizando a mesma metodologia, entretanto as triagens por fagos foram realizadas a partir de amostras de água do rio São Bartolomeu, numa região onde há grande despejo de esgoto doméstico e as bactérias utilizadas foram isoladas da água de alimentação do sistema de osmose inversa. O meio de cultura usado nesse isolamento foi caldo nutriente CN (peptona 5 g/L, extrato de levedura 3 g/L, NaCl 5 g/L, pH 7,2), meio em que as bactérias foram isoladas no CPQBA/UNICAMP.

4.5 Propagação viral

Culturas bacterianas recentes foram cultivadas em 15 mL de meio LB até atingirem DO₆₀₀ igual a 0,7. Às culturas estas foram adicionadas placas de lise individuais e incubadas por 12 horas sem agitação, a 37°C. Após o período de incubação foi adicionado igual volume dos meios específicos de cada hospedeiro bacteriano (Mod ou R2A) estéril, sendo incubado por 4 horas sob as mesmas condições. Em seguida foi acrescentado clorofórmio 10% (v/v) e NaCl na concentração final de 1M, com o objetivo de romper as células bacterianas e dissociar os fagos dos restos celulares. As suspensões foram homogeneizadas e mantidas a 4°C por 1 hora, seguido por centrifugação a 5000xg, por 20 minutos a 4°C, para sedimentação de restos celulares e separação de fases. A fase aquosa foi cuidadosamente recolhida e transferida para tubos estéreis, sendo armazenados a 4°C. As amostras foram plaqueadas em seguida para avaliação do sucesso da técnica e viabilidade dos fagos (Eller et al, 2012). O mesmo procedimento foi realizado na propagação dos fagos específicos, a única modificação foi o meio utilizado, neste caso o CN.

4.6 Caracterização morfológica

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi utilizada na caracterização morfológica dos fagos isolados. Para tanto, dez microlitros da suspensão viral foram adicionados a uma *grid* de 200 *mesh*, previamente cobertos com Formvar[®] e incubados por 5 minutos. O excesso foi removido com papel de filtro, e em seguida a *grid* coberta com 10 µL de acetato de uranila 2% (p/v), durante 15 segundos. No estudo foi utilizado o microscópio de transmissão Zeiss EM 109 MET operando a 80 kV do Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Diluições foram realizadas para obtenção de imagens de melhor qualidade, quando necessário. Para classificar os fagos foram feitas análises morfológicas, tais como a presença de cauda, o comprimento da cauda e o diâmetro da partícula viral (Belgini et al, 2014).

4.7 Caracterização molecular dos bacteriófagos

4.7.1 Caracterização genômica

O DNA genômico do fago foi extraído pelo método da proteinase K, de acordo com protocolo descrito por Dias et al (2013a). Concentrados virais foram obtidos pelo método do PEG e a eles foram adicionados Proteinase K e SDS nas concentrações de 50 g/mL e 0,5% (p/v), respectivamente. As amostras foram incubadas por 1 hora a 56 °C e após o período de incubação foi adicionado igual volume de fenol tamponado (Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, Missouri, USA). Os tubos foram agitados suavemente por 30 segundos, e as fases, aquosa e orgânica, separadas por centrifugação a 4.000xg por 5 minutos. A fase aquosa foi transferida para outro tubo e a ela adicionado igual volume de uma solução fenol-clorofórmio na proporção de 1:1. Após nova centrifugação sobre as mesmas condições, foi adicionado à fase aquosa igual volume de clorofórmio. Após nova centrifugação, a fase aquosa foi recolhida e a ela adicionado etanol gelado na proporção de 2:1, visando à precipitação do DNA fágico. A mistura foi mantida em gelo por 30 minutos e então centrifugada a 11.000xg por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado suspenso em água destilada e deionizada.

O material genético obtido foi quantificado e tratado com Ribonuclease A (Fermentas International, Inc. Canada) e Desoxirribonuclease I (Sigma-Aldrich, Inc. USA), conforme recomendação do fabricante. Após os tratamentos, as amostras foram

submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,4% em tampão TAE 1X (Tris 40mM, ácido acético 20mM e EDTA 1 mM, pH 8,0), sob uma voltagem de 30V por 24 horas.

4.7.2 Random Amplified Polymorphic DNA – RAPD

A técnica de RAPD foi aplicada para avaliar a diversidade genética e o polimorfismo dos fagos. O programa de PCR consistiu de quatro ciclos de 94 °C por 45 s, 30 °C por 120 segundos e 72 °C por 60 segundos, 26 ciclos a 94 °C durante 5 segundos, 36 °C por 30 segundos e 72 °C durante 30 segundos (o passo de extensão foi aumentada em 1 segundo para cada novo ciclo) e um passo final de 10 minutos a 75 °C. A amplificação foi realizada em reações de 25 µL usando 2X Taq Master Mix (Vivantis Technologies, Malásia), 8mM de cada primer por reação individual e 10 ng de DNA genômico. Os resultados da amplificação por PCR foram confirmadas através de gel de agarose a 1,5%, corado com GelRed 10.000x (Biotium, USA). Na reação foram usados os primers: OPL5 (5'-ACGCAGGCAC-3') e P2 (5'-AACGGGCAGA-3'), como descrito por (Gutierrez et al, 2011).

4.8 Análise de formação de biofilme

A formação de biofilme aderido à superfície foi avaliada utilizando células bacterianas cultivadas em meio caldo nutriente (Peptona a 5 g/L, extrato de levedura a 3 g/L, NaCl a 5 g/L) a 37 °C, sob agitação de 150 rpm. As suspensões com DO₆₀₀ igual a 0,1 foram inoculadas em placas de microtitulação de 96 poço e incubadas a 37 °C durante 24 h. A quantificação da biomassa foi realizada utilizando o método de coloração por cristal violeta (CV) (Extremina et al, 2011; O'Toole, 2011). Após 24 h de incubação, o meio de cultura foi removido e as células aderentes foram lavadas três vezes com PBS 0,2 M (pH 7,4). Estas foram secas em temperatura ambiente por 1 hora e então adicionado a cada poço 200 µL de solução de CV a 0,1% (p/v). Após 30 minutos, o excesso de corante foi removido e o biofilme descorado pela adição de 250 µL de solução de etanol/acetona (80:20, v/v) a cada poço. A solução de etanol/acetona foi cuidadosamente pipetada para solubilizar completamente o CV, e então transferida para uma nova placa de microtitulação de 96 poços. A DO₆₀₀ foi mensurada utilizando leitor de placas (VersaMax, Molecular Devices). Os valores de DO₆₀₀ são proporcionais à quantidade de biomassa, que compreende as células e material polimérico extracelular. Todo o experimento foi realizado em triplicata e os valores resultantes foram calculados.

4.9 Controle da formação de biofilme por fagos

4.9.1 Sistema MBEC

As bactérias isoladas que demonstraram maior capacidade de formação de biofilme, ou seja, maior produção de biomassa, foram selecionadas para o ensaio de biocontrole empregando fagos. Colônias ativadas previamente foram cultivadas durante 12 horas, após esse período um novo repique foi realizado e a densidade óptica monitorada. As suspensões bacterianas com DO_{600} igual a 0,7 foram diluídas em PBS 0,2M pH 7,4 e inoculadas em meio caldo nutriente a fim de se obter $1,0 \times 10^9$ células, separadamente, em cada poço do sistema MBEC[®]. As suspensões de fagos foram adicionadas em volumes diferentes, obtendo multiplicidade de infecção (*multiplicity of infection* – MOI – n° vírus/n° células) igual a 0,01; 0,02; 0,03 e 0,04, a partir dos respectivos valores de unidades formadoras de placas (UFP) $1,0 \times 10^7$, $2,0 \times 10^7$, $3,0 \times 10^7$ e $4,0 \times 10^7$. Após os diferentes tempos de incubação, os pinos presentes na tampa do sistema MBEC[®] foram lavados por imersão em PBS 0,2M pH 7,4 e corados, também por imersão em solução de cristal violeta. Após 30 minutos o excesso de corante foi removido e os pinos submersos em solução etanol/acetona (80:20 v/v), e a DO_{600} mensurada, como descrito no item anterior.

4.9.2 Sistema alternativo

As suspensões com DO_{600} igual a 0,7 foram inoculadas (inoculo de $1,0 \times 10^9$ células) em placas de cultivo celular de 24 poços contendo lamínulas circulares no fundo de cada um e incubadas a 37 °C durante 24 h. As suspensões de fagos foram adicionadas em volumes diferentes, obtendo MOI igual a 0,01; 0,02; 0,03 e 0,04. Após 24 h de incubação, o meio de cultura foi removido e as células aderentes foram lavadas três vezes com PBS 0,2 M (pH 7,4). As placas foram secas em temperatura ambiente por 1 hora, as lamínulas transferidas para novas placas de 24 poços e então adicionado a cada poço 200 µL de solução de CV a 0,1% (w/v). Após 30 minutos, o excesso de corante foi removido e o biofilme descorado pela adição de 250 µL de solução de etanol/acetona (80:20, v/v) a cada poço. A solução de etanol/acetona foi cuidadosamente pipetada para solubilizar completamente o CV, e então transferida para uma nova placa de microtitulação de 96 poços. A DO_{600} foi mensurada utilizando leitor de placas (VersaMax, Molecular Devices). Os mesmos procedimentos de cultivo

estabelecidos para o cristal violeta foram utilizados a fim de se obter pinos e lamínulas para análise morfológica por MEV.

4.10 Análise de formação de biofilme em membranas de osmose inversa

4.10.1 Sistema piloto de osmose inversa

Neste trabalho foi avaliada a formação de biofilme no sistema piloto de osmose inversa (Figura 7). O sistema é constituído de um sistema moto-bomba que succiona a água de um reservatório de 20 litros. A bomba utilizada é do tipo “deslocamento positivo” e movimenta fluido para seis membranas de osmose inversa tubulares (modelo AFC99, PCI Membranes, Hampshire, Reino Unido), arranjadas em série. As membranas possuem 1,2 m de comprimento, 100 mm de diâmetro, área de 0,9 m². O sistema operou com pressão de 80 psi, durante 30 dias. Devido a dificuldades em manter o fluxo de efluente continuamente renovado, um esquema de retroalimentação foi estabelecido, no qual o concentrado e o permeado eram misturados e recirculados no sistema.

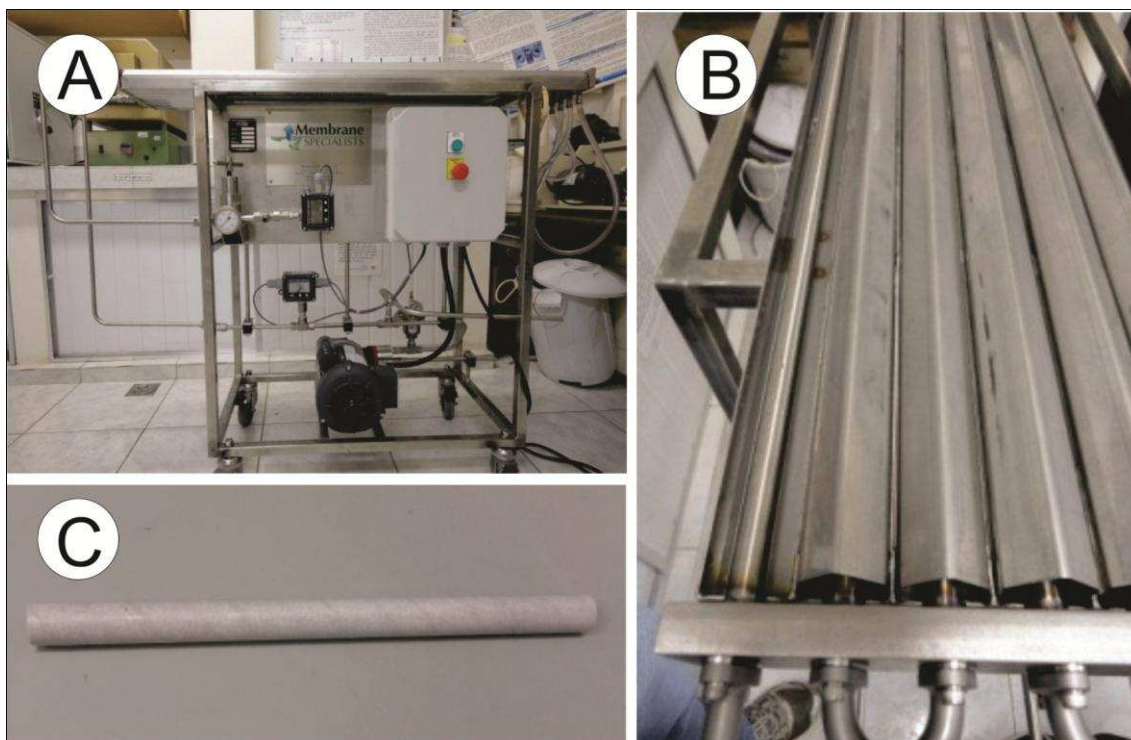


Figura 7 Sistema de osmose inversa piloto utilizada neste trabalho. A- visão lateral do sistema de osmose, B- visão da porção superior do sistema, é possível observar o tubo metálico onde as membranas são inseridas e C- membrana de poliamida tubular utilizada nos ensaios de formação de biofilme.

O sistema foi mantido no laboratório de Meio Ambiente, Universidade Federal de Viçosa. O sistema foi alimentado por 30 dias com água de alimentação do sistema de

osmose inversa da REGAP. As membranas de osmose foram retiradas em duplicata, divididas em partes com cerca de 10 cm, sendo os dias de retirada: 1°, 3°, 7°, 15° e 30° dias. A escala de retirada é apresentada na figura 8.

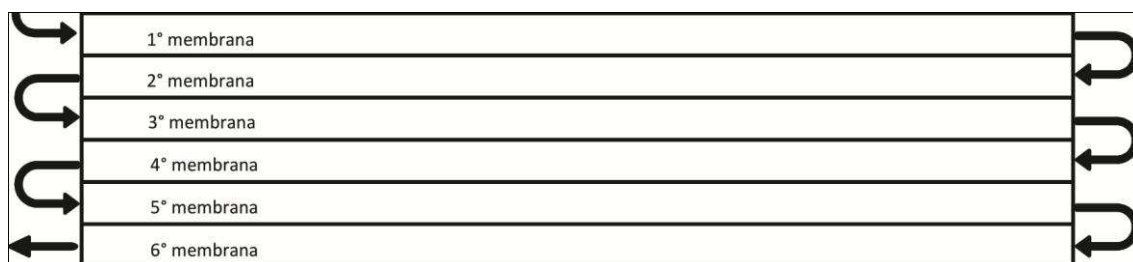


Figura 8 Esquema de retirada da membrana, onde a primeira membrana está próxima à entrada do efluente a ser tratado e a última próxima a saída do concentrado.

4.10.2 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada com o objetivo de avaliar a formação do biofilme sobre membranas de osmose inversa operando em um sistema piloto (figura 7) e sobre os dois sistemas avaliados neste estudo, o MBEC[®] e o sistema alternativo com lamínulas. Os procedimentos de preparo da amostra são iguais para as três amostras, os pinos e as lamínulas e os segmentos de membrana. As amostras foram lavadas 2 vezes por imersão em PBS 0,2 M pH 7,2 e fixados em glutaraldeído 2,5% (v/v) em tampão PBS 0,2 M pH 7,4, à temperatura ambiente por 2 horas. Em seguida, os pinos foram lavados três vezes por imersão em tampão PBS 0,2 M pH 7,4. As amostras foram submetidas à desidratação em série de concentração crescente de etanol (30 a 100% v/v) por 10 minutos cada, à temperatura ambiente. A desidratação em etanol 100% foi repetida três vezes a fim de obter máxima retirada da água. Imediatamente após a última etapa de desidratação, as amostras foram submetidas à secagem no ponto crítico (Critical Point Dryer - CPD[®], Bal-tec, modelo 030). Em seguida foram fixados em porta-espécimes (stubs) com fita dupla face e cobertos com aproximadamente 15 nm de ouro em metalizador (Sputtercoater, Balzers, modelo FDU 010). Finalmente as amostras foram examinadas no Microscópio Eletrônico de Varredura Leo 1430 VP do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, operando a 20 kV para a obtenção das imagens (Wang et al, 2012).

4.10.3 Microscopia de varredura confocal a laser

A Microscopia de varredura confocal a laser, ou resumidamente, microscopia confocal, foi realizada com o objetivo de avaliar a viabilidade celular em diferentes

níveis de profundidade do biofilme. Para tanto, segmentos de 3x 1 cm, foram retirados das membranas de osmose inversa e lavados 2 vezes por imersão em PBS 0,2 M pH 7,4. Após as lavagens, os segmentos foram corados segundo metodologia de Calich et al (1979) com modificações. Os cupons foram incubados na ausência de luz por 15 minutos com mistura de iodeto de propídeo (IP) 20 µg/mL e isotiocianato de fluoresceína (FITC) 2 µg/mL em PBS 0,2 M pH 7,4, preparada imediatamente antes do uso. Após incubação, os cupons foram lavados por imersão em PBS 0,2 M pH 7,4 e analisados no Microscópio Confocal de Varredura a Laser, marca Zeiss, modelo LSM 510 META utilizando o laser argônio (comprimentos de onda 458 e 514 nm) do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV. As células com coloração esverdeada foram consideradas vivas ou viáveis e aquelas que apresentavam cores amareladas ou avermelhadas foram consideradas mortas (Wang et al, 2012).

5 Resultados

5.1 Isolamento bacteriano a partir de lodos ativados

Foram isoladas 8 bactérias, sendo identificadas como: M1, M2, M3, M4, R1, R2, R3 e R4. Das oito bactérias isoladas, foi possível o isolamento de fagos líticos contra apenas 4, as quais tiveram o rRNA 16S sequenciado e comparado em bancos de dados utilizando o *software* BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Os isolados foram identificados como *Arthrobacter soli* e *Arthrobacter nicotianae*, como observado nas árvores filogenéticas (Figura 9).

5.2 Isolamento e propagação de bacteriófagos

Foram isolados 4 bacteriófagos nas amostras de lodo ativado da REGAP, os quais foram identificados de acordo com o meio e a bactéria de isolamento: UFVR2halophage, UFVR3halophage, UFVM3halophage e UFVM4halophage. Os fagos isolados mostraram-se altamente líticos, como observado na figura 10.

5.3 Caracterização morfológica

A partir da microscopia eletrônica de transmissão foi possível perceber as mesmas características morfológicas para todos os fagos, com tamanho médio de 33 nm, cauda curta com aproximadamente 3nm, e cabeça isométrica em torno de 25 nm de diâmetro, o que o classifica como pertencente à família *Podoviridae*, ordem *Caudovirales* (Figura 11).

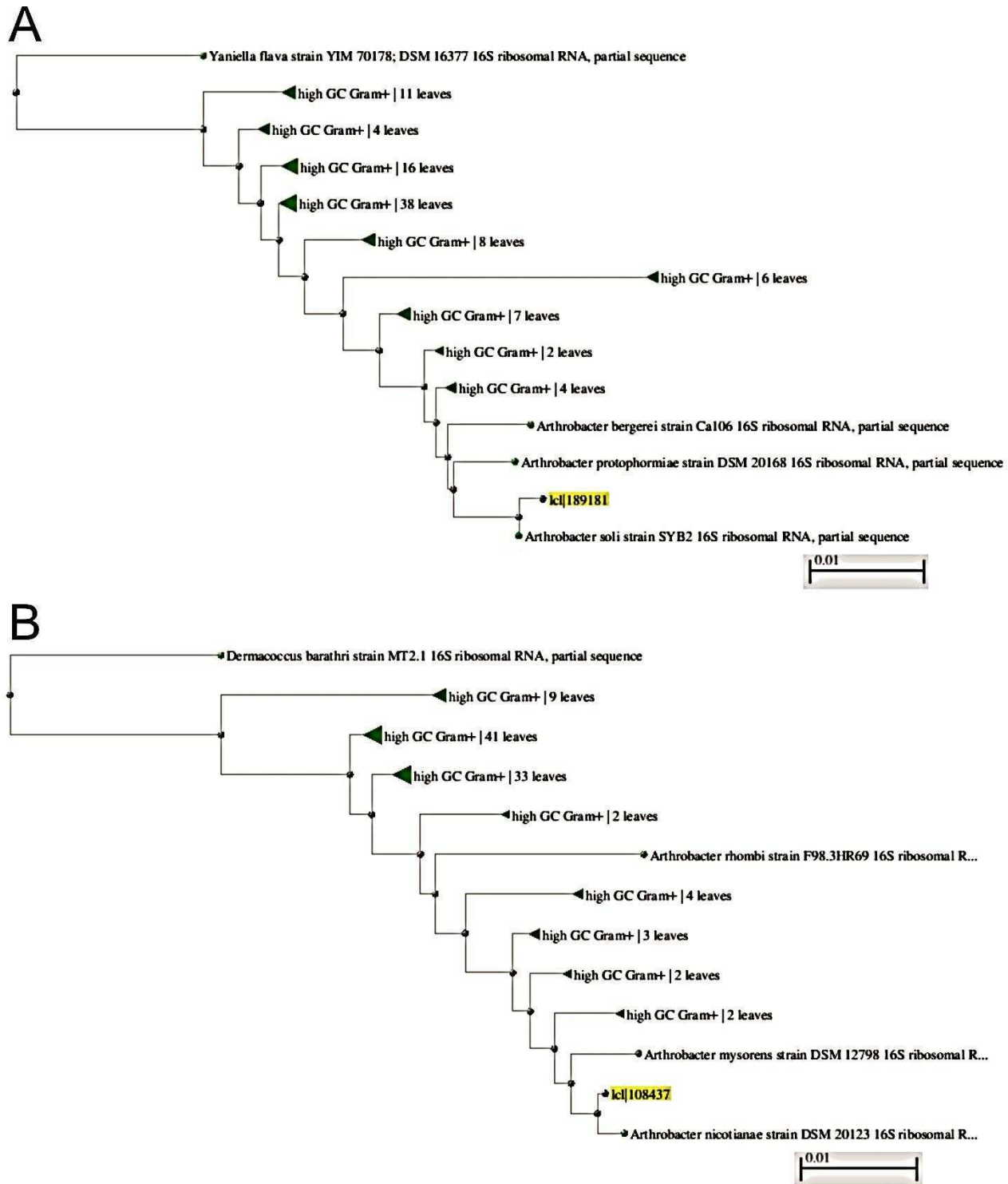


Figura 9 Árvores filogenéticas demonstrando a presença dos isolados no cluster do gênero *Arthrobacter*. A- isolados R2 e R4, B- isolados M3 e M4. Árvore obtida pelo método Fast Minimum Evolution.

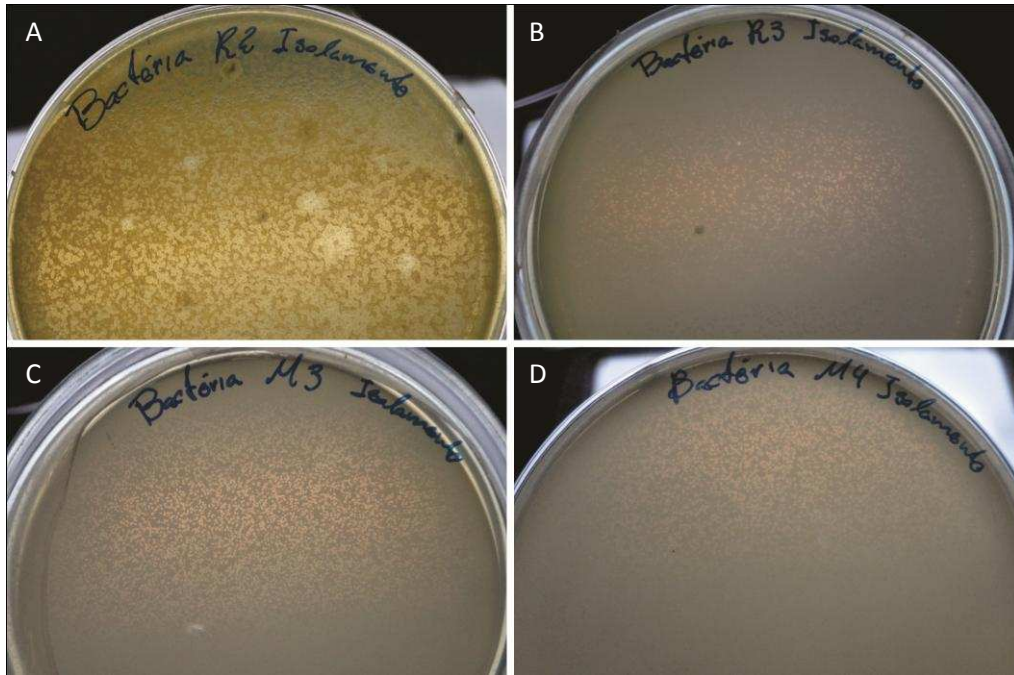


Figura 10 Fagos isolados em bactérias do gênero *Arthrobacter*, denominados: UFVR2halophage (A), UFVR3halophage (B), UFVM3halophage (C) e UFVM4halophage (D).

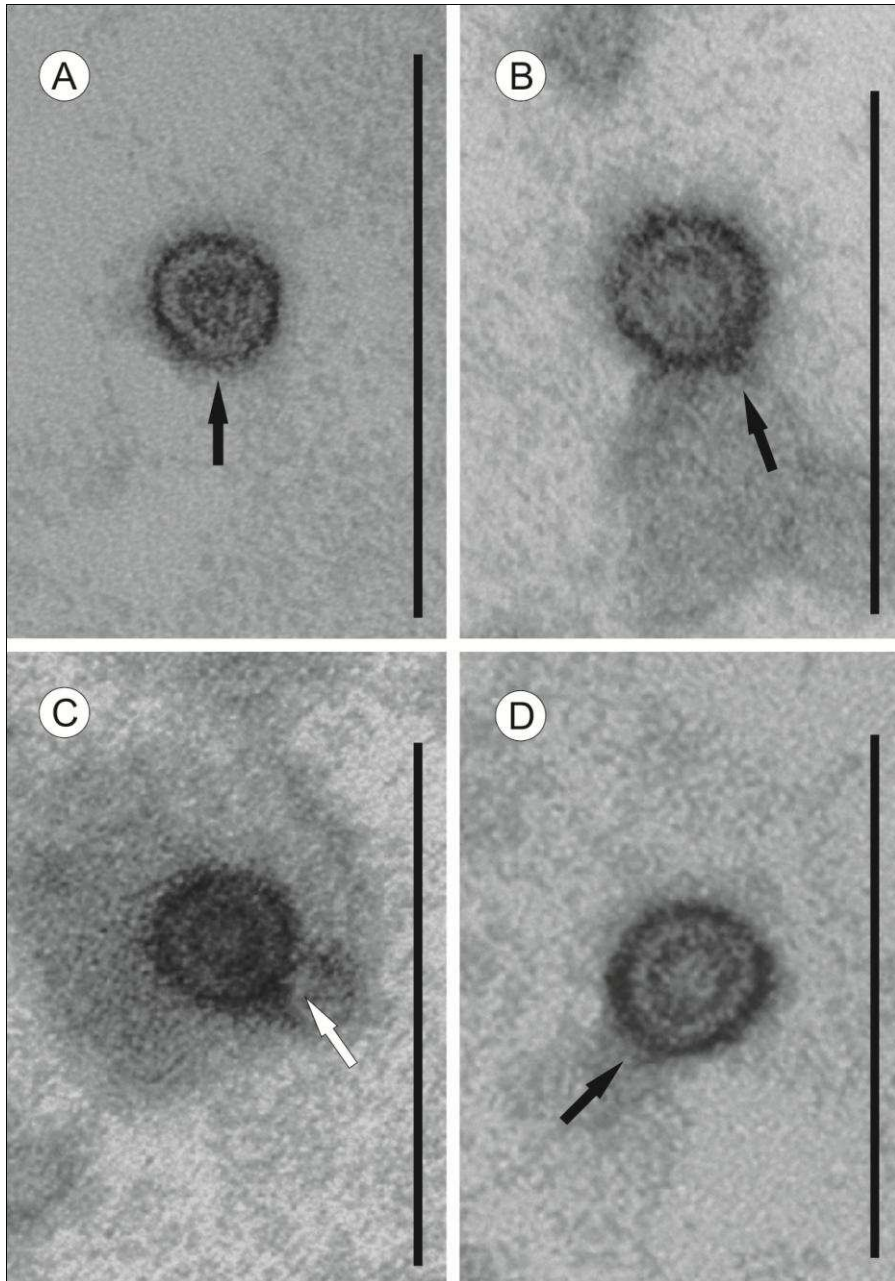


Figura 11 Microscopia eletrônica de transmissão. As micrografias mostram as semelhanças morfológicas dos quatro fagos isolados: UFVR2halophage (A), UFVR3halophage (B), UFVM3halophage (C) e UFVM4halophage (D). A presença de uma pequena cauda (seta) classifica como membro da família *Podoviridae*, ordem *Caudovirales*. As barras representam 100 nm.

5.4 Caracterização molecular de bacteriófagos

5.4.1 RAPD

Os padrões obtidos pela técnica de RAPD revelaram que os fragmentos amplificados variaram entre 500 pb e 5 kb, com 14 bandas polimórficas para *primer* P2 e 12 bandas para o *primer* OLP5 (Figura 12). Os quatro isolados mostraram-se idênticos com relação ao polimorfismo, que, juntamente com a análise morfológica e

genômica nos levou a concluir que se trata de um único fago com dois hospedeiros pertencentes ao gênero *Arthrobacter*.

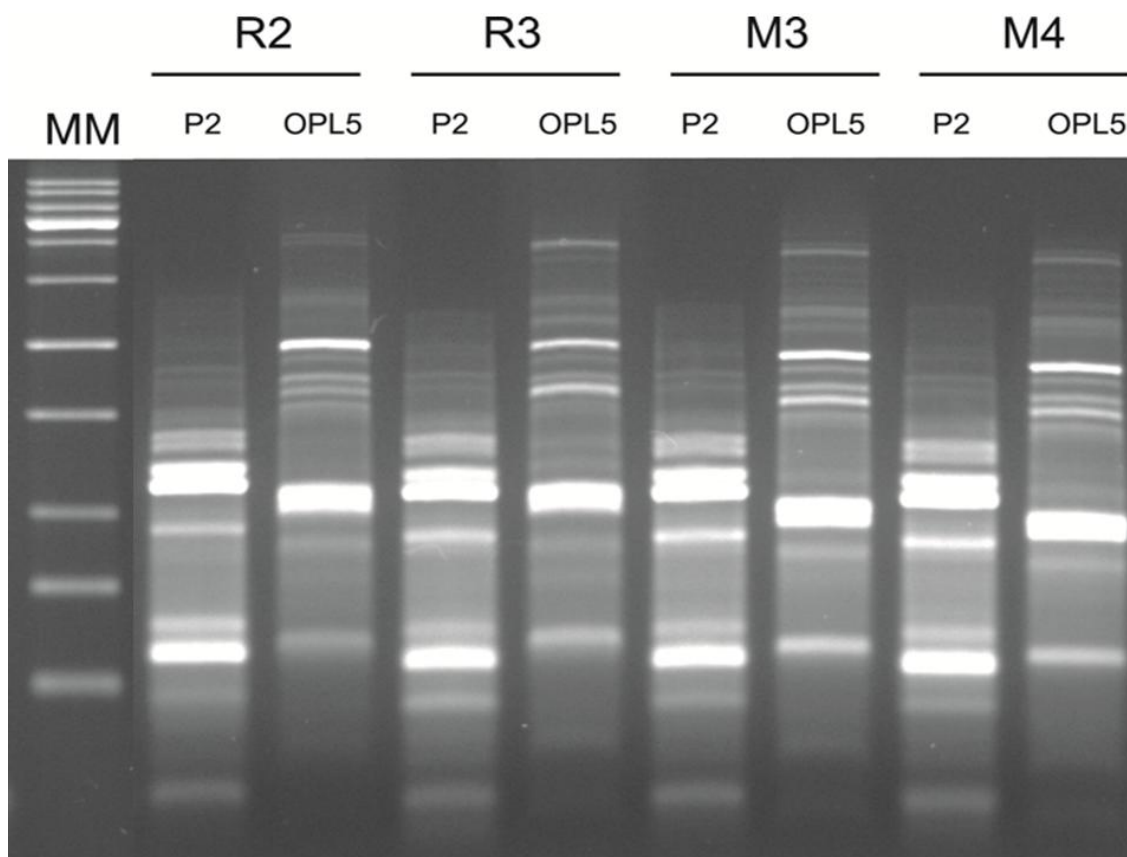


Figura 12 Tipagem por RAPD dos fagos isolados, utilizando os *primers* OPL5 e P2. Padrão de amplificação para os isolados a partir do lodo ativado.

5.4.2 Peso molecular e composição genômica

Os genomas virais submetidos ao tratamento com DNase e RNase foram observados após eletroforese. Foi possível perceber a ausência de banda quando tratado com DNase, evidenciando a composição de DNA do genoma viral. Na figura 13 é possível observar a banda respectiva ao genoma viral na amostra tratada com RNase, apresentando peso molecular de aproximadamente 21.6 kb, composto por DNA.

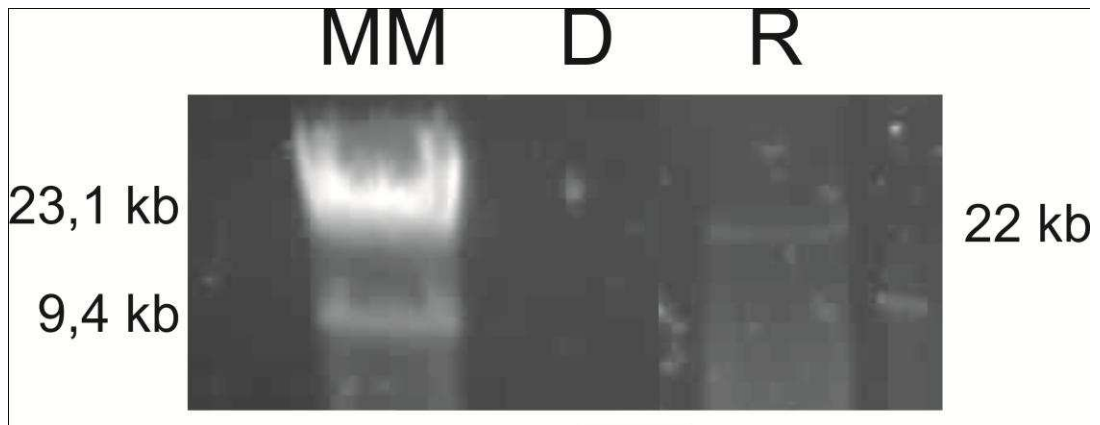


Figura 13 Eletroforese de gel de agarose do genoma viral. MM – Marcador de peso molecular λ HindIII (New England Biolabs Ltd. Canada), D – DNase e R – RNase.

5.5 Avaliação da formação de biofilme dos isolados bacterianos

Devido ao fato de alguns isolados não crescerem após plaqueamentos consecutivos, dentre as 30 bactérias isoladas, apenas 26 foram testados quanto à sua capacidade de formar biofilme. Entre os 26 isolados testados, 11 (42%) foram classificados como bons formadores de biofilme, embora em níveis diferentes (Figura 14).

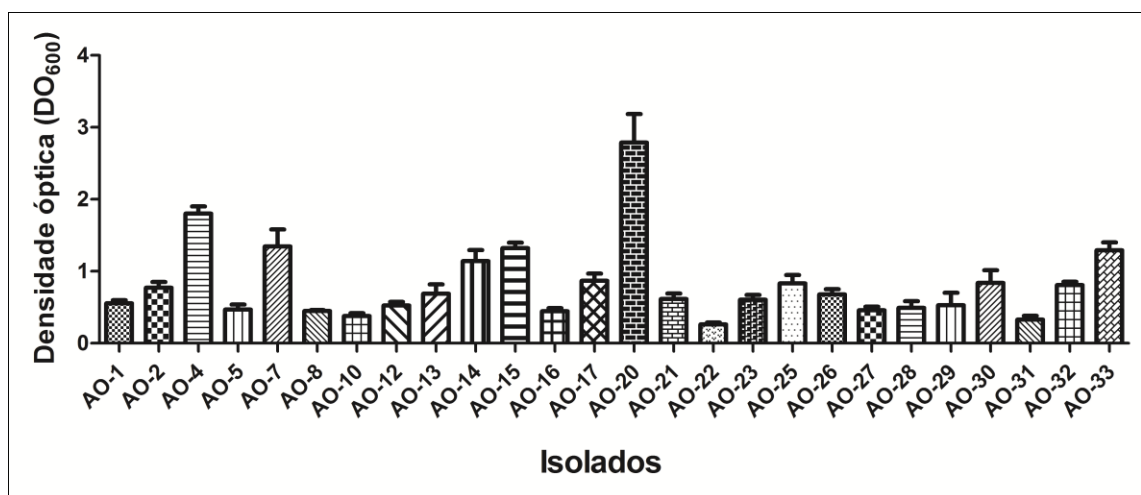


Figura 14 Valores de DO_{600} do ensaio de CV dos isolados bacterianos de água de alimentação como uma medida indireta da biomassa. Os valores são apresentados como média das triplicatas.

5.6 Análise da influência de fagos na formação de biofilme

Com base nos resultados de RAPD, os quatro fagos isolados foram agrupados e renomeados como vB_AspP-UFV1 (UFV1). Este fago foi utilizado nos ensaios de

controle biológico. Após adição do fago, foi observada redução significativa na biomassa para algumas das estirpes testadas, por exemplo, *A. soli* (AO1-02), *Pseudomonassp.* (SA2-07) e *Brevundimonassp.* (SA1-30 e SA1-33). O fago não afetou a formação de biofilme de *Azospirillumsp.* (AD-20) (Figura 15). A variação do MOI causou redução de maneira dose-dependente em alguns isolados testados, no entanto, para outros a variação do MOI não causou modificação nos resultados encontrados para o MOI de 0,01 (Figura 16).

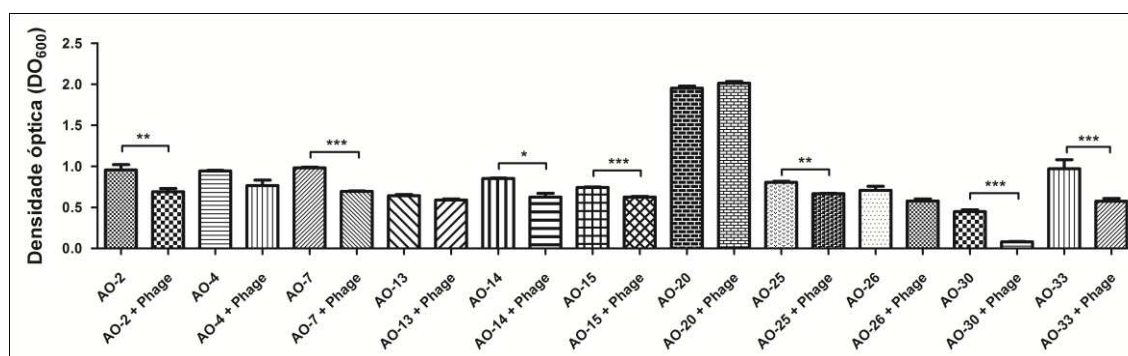
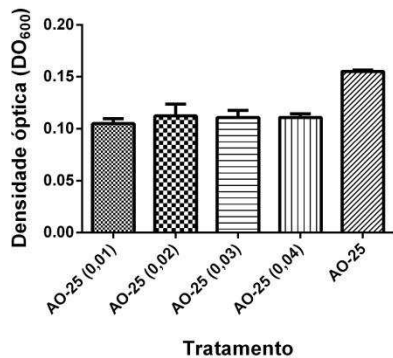


Figura 15 Efeito do bacteriófago UFV1 sobre o biofilme formado pelas bactérias isoladas da água de alimentação. As médias \pm desvio padrão das triplicatas são ilustradas (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).

5.7 Análise de dose dependência na influencia do fago UFV1 sobre o biofilme

Com o objetivo de avaliar a influência do fago UFV1 sobre o biofilme em diferentes doses, foram utilizados dois sistemas: o sistema MBEC e o sistema alternativo, o qual é baseado na formação de biofilme sobre uma lamínula depositada no fundo dos poços de uma placa e cultura com 24 poços. A partir dos resultados com CV, foi possível perceber uma redução dose dependente para o isolado A01-26 utilizando o sistema MBEC[®], com uma maior redução nos valores de DO com o aumento nos MOI's utilizados, entretanto o mesmo comportamento não foi observado para o sistema alternativo em nenhuma das bactérias avaliadas (Figura 16).

MBEC



Sistema alternativo

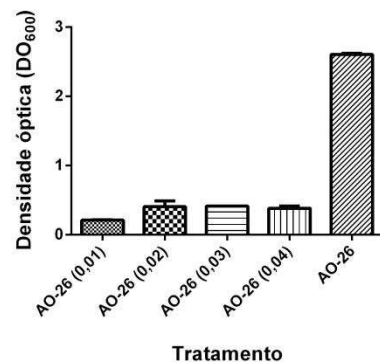
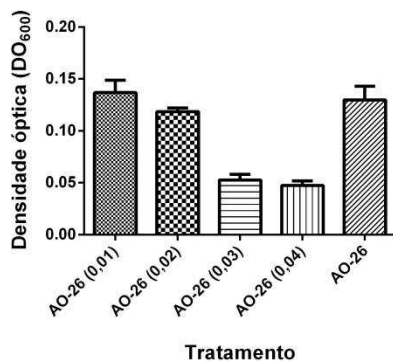
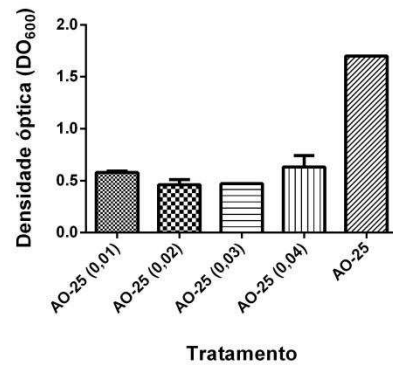


Figura 16 Redução do biofilme encontrado para as bactérias A01-25 e A01-26, quando submetidas a diferentes concentrações fágicas, nos sistemas avaliados.

É interessante notar que, apesar de um maior valor nas DO's encontradas no sistema alternativo, quando observadas às micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), houve um fraco crescimento bacteriano sobre a lamínula para os dois isolados avaliados (Figura 17). O isolado A01-25 também apresentou dose dependência com 48 horas de incubação, quando avaliado por MEV (figura 18).

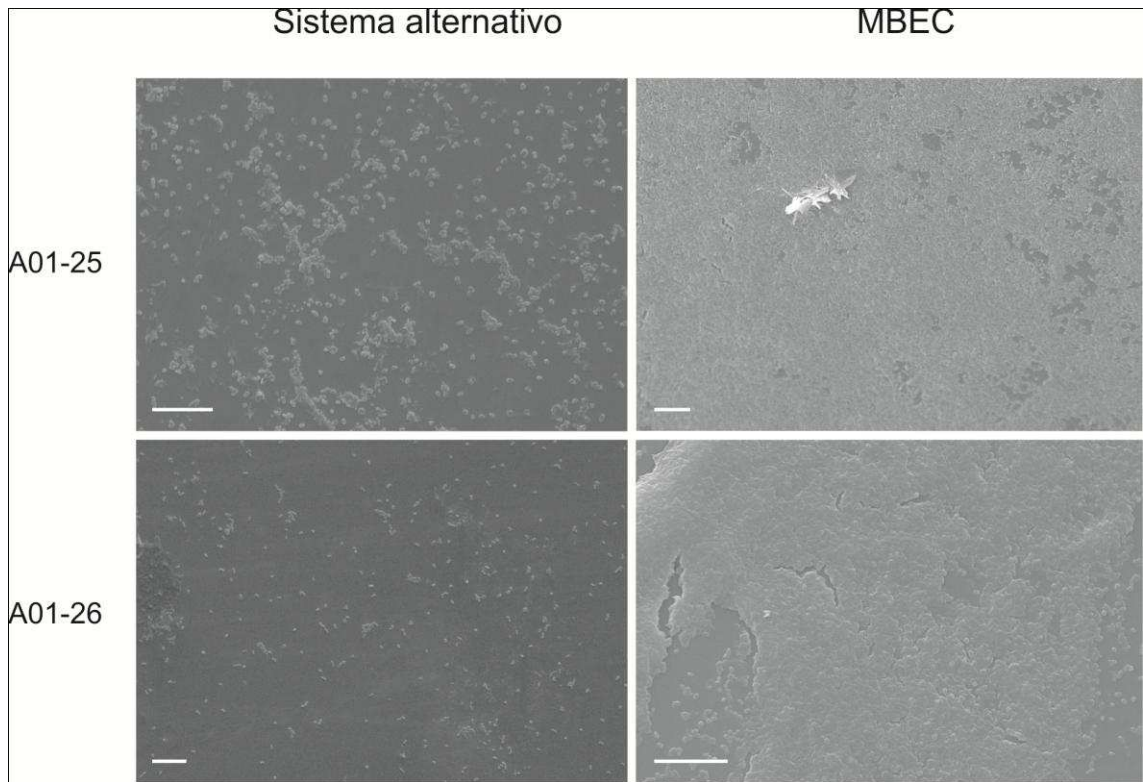


Figura 17 Microscopia eletrônica de varredura. As micrografias mostram a grande diferença na adesão de bactérias nos dois sistemas avaliados, com dois isolados diferentes, A01-25 e A01-26, *Pseudomonas* sp e *Brevundimonas* sp., respectivamente. As barras representam 10 μ m.

Diante dos resultados encontrados, foram avaliados diferentes tempos de incubação no sistema MBEC[®], o que demonstrou haver diferença na influencia do fago sobre o biofilme, em diferentes tempos de incubação da bactéria na presença do fago UFV1. Para tempos de incubação de 48 horas ambos os isolado, A01-25 e A01-26, apresentaram resposta dose dependente, como pode ser observado nas micrografias do isolado A01-25 (Figura 19), o que não havia sido observado no tempo de 24 horas para o isolado A01-26 (Figura 16).

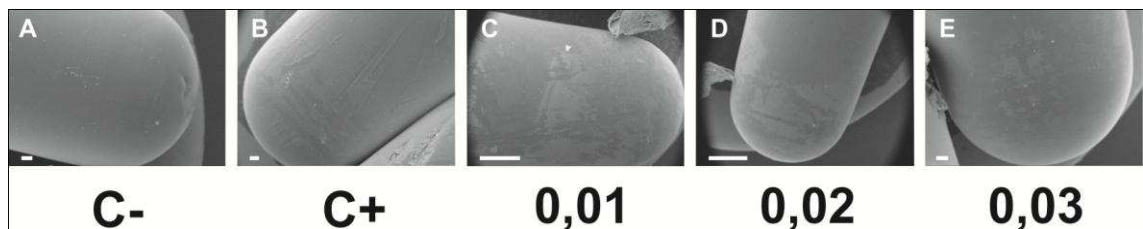


Figura 18 MEV. São apresentados os resultados do ensaio de dose dependência para o isolado A01-26 com 24 horas de incubação. As barras representam: 200 μ m (A, B e E) 1 mm (C e D).

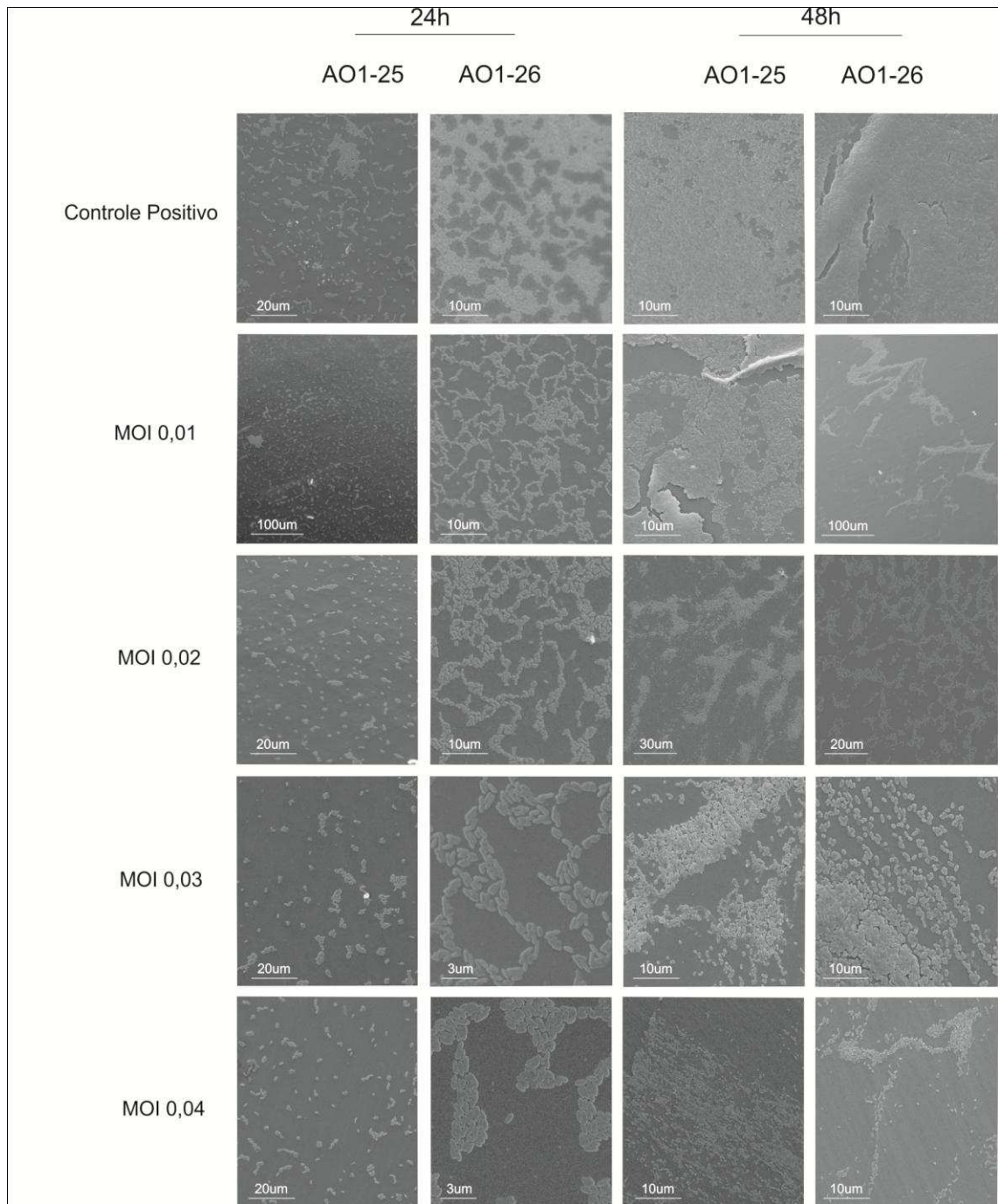


Figura 19 Micrografias eletrônicas de varredura mostrando ensaios de controle de biofilme com tempos de incubação de 24 e 48 horas.

5.8 Caracterização do biofilme formado nas membranas de osmose inversa

5.8.1 MEV

A partir das micrografias obtidas é possível perceber a ausência de microorganismos aderidos à membrana no primeiro dia de ensaio. As setas brancas na figura 20A e C mostram rugosidades presentes nas membranas de poliamida utilizadas neste estudo (Figura 20). Entretanto no terceiro dia já é possível perceber a presença de

micro-organismos aderidos às rugosidades presentes na membrana (Figura 20A e F). No sétimo dia estão presentes microcolônias envoltas por material extracelular e células individualizadas (Figura 20H), sendo possível ver a presença de uma fina camada de biofilme sobre a membrana de osmose (Figura 20I). No 15º dia há grande quantidade de material extracelular, sendo possível perceber a presença de redes de exopolissacarídeos e outras macromoléculas entre as diversas células constituintes do biofilme (Figura 20J), além de protozoários constituindo a microbiota do biofilme e fossas para difusão de nutrientes (Figura 20L).

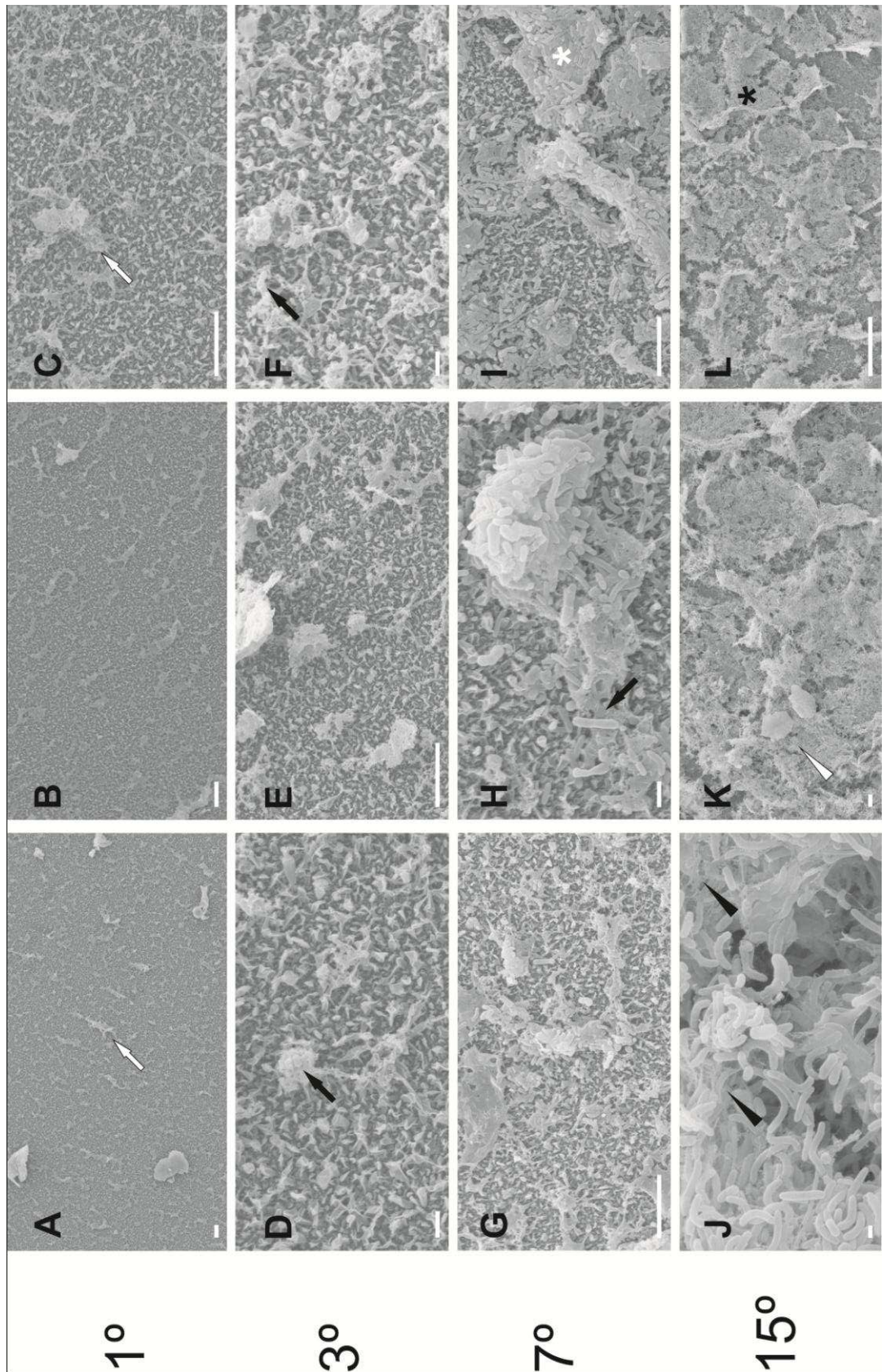


Figura 20 Microscopia eletrônica de varredura. São apresentados os diferentes dias de crescimento avaliados, onde observamos: (A-C) a presença de rugosidade (setas brancas) e a ausência de micro-organismos aderidos no primeiro dia; (D-F) no terceiro dia são observados micro-organismos individuais aderidos às rugosidades (setas pretas); (G-I) microcolônias são observadas aderidas às membranas no sétimo dia e micro-organismos individualizados (setas pretas), além de uma fina camada de biofilme já formado (asterisco branco); (J-L) biofilmes bem estabelecidos são vistos com 15 dias de alimentação. Grande quantidade de material extracelular é observado (cabeça de seta preta), além de uma maior diversidade microbiológica com a presença de protozoários (cabeça de seta branca). São observados também a presença de sulcos no filme para a difusão de nutrientes (asterisco preto).

5.8.2 Confocal

A microscopia de varredura confocal a laser foi realizada com o objetivo de avaliar, em diferentes profundidades, a viabilidade de células em toda a extensão do biofilme. Os resultados encontrados corroboram com o observado na microscopia eletrônica de transmissão, no qual é possível observar a ausência de células aderidas, seja pela observação de uma visão superior (Figura 21A) ou nas diferentes profundidades (21F). No terceiro dia são encontradas poucas microcolônias, que podem ser observadas com maior aumento na figura 21B e 21G, já no sétimo dia, diversas microcolônias são observadas ao longo do campo de visão, todas formadas predominantemente por células viáveis, com poucas células mortas. Com 15 dias de alimentação o sistema apresenta um biofilme espesso, com grande quantidade de células viáveis, o que pode ser observado pelos diferentes campos focais observados (21I). Nesta análise foi realizada a observação do 30º dia de operação do sistema de OR, que mostrou um biofilme denso, entretanto formado por células, em sua grande maioria, mortas (21J). É possível observar a presença de organismos maiores, provavelmente protozoários, vivos e mortos (21E).

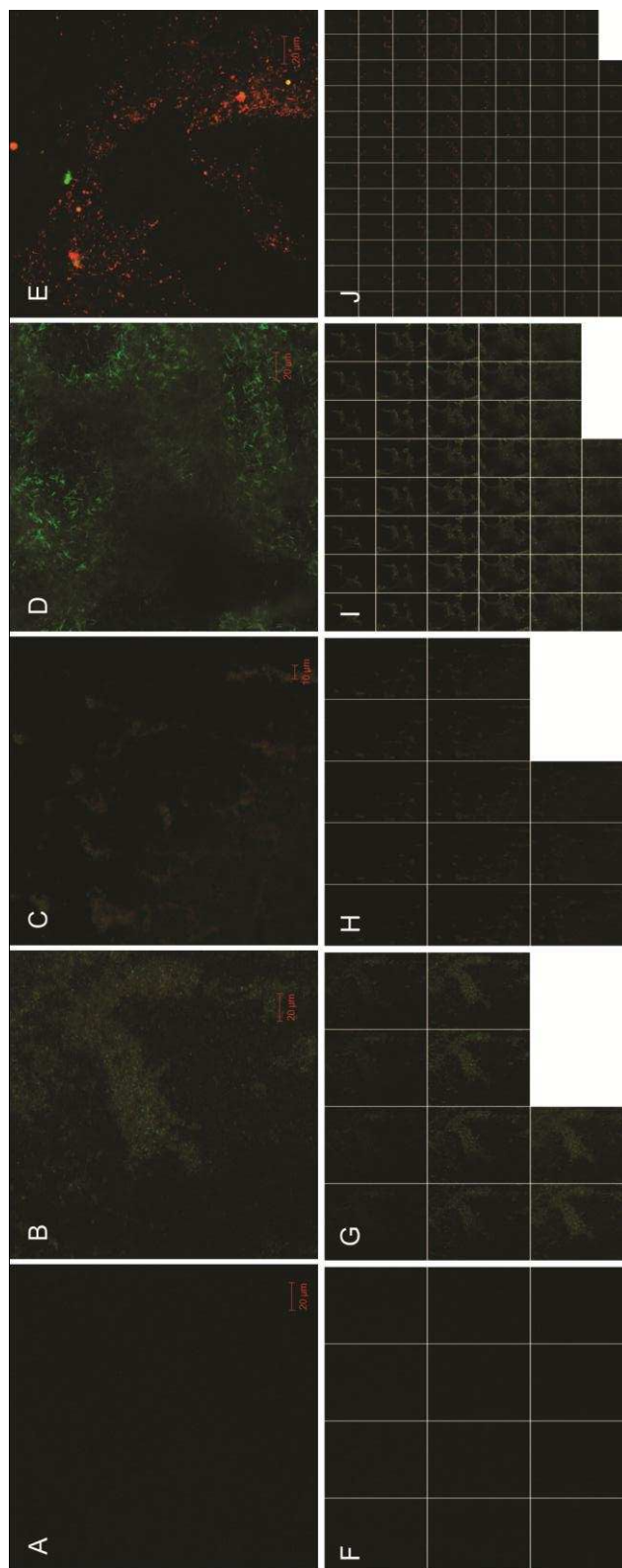


Figura 21 Microscopia confocal de varredura a laser. As micrografias demonstram a cinética no crescimento do biofilme sobre as membranas de OR. No 1º dia de ensaio não são observados micro-organismos aderidos, o que é observado pela ausência de fluorescência verde (células vivas) ou vermelha (células mortas), proporcionado pelo FITC e pelo IP, respectivamente (A,F); uma microcolônia é observada com maior aumento no 3º dia, é possível perceber a predominância de células viáveis (B,G); grande quantidade de microcolônias está presente no 7º dia (C,H); o biofilme maduro, espesso, pode ser observado no 15º dia, é possível perceber também a predominância de células viáveis (D,I), diferente do 30º dia, onde há predominância de células mortas, indicado pela coloração vermelha das células (E,J).

5.9 Isolamento e propagação de fagos específicos

Também foram isolados fagos específicos contra bactérias presentes na água de alimentação do sistema de osmose inversa. Na figura 22 é possível observar a presença do material genético viral. Foram isolados bacteriófagos específicos contra as bactérias *Azospirillum* sp. (A01-20), *Pseudomonas* sp. (A01-25) e *Brevundimonas* sp. (A01-26). Foram isolados um fago contra a bactéria *Azospirillum* sp. e dois fagos contra as bactérias *Pseudomonas* sp. e *Brevundimonas* sp. Os fagos foram identificados de acordo com o isolado utilizado e a ordem do isolamento: A01-20 (20); A01-25 (25), isolados 1 e 2; A01-26 (26), isolados 1 e 2.

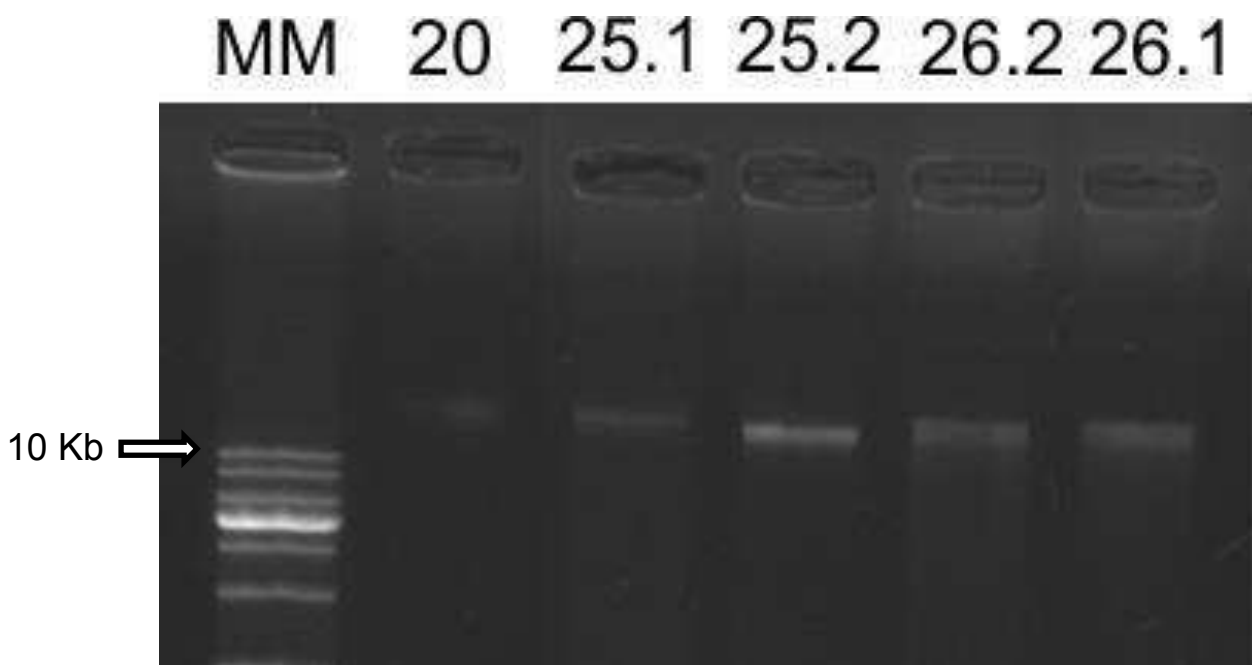


Figura 22 Eletroforese em gel de agarose. São apresentados os genomas virais submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%. MM- marcador de peso molecular de 1Kb (New England Biolabs Ltd. Canada); 20 - genoma do fago contra isolado A01-20; 25.1 - genoma do primeiro fago contra isolado A01-25; 25.2 - genoma do segundo fago contra isolado A01-25; 26.1 - genoma do primeiro fago contra isolado A01-26 e 26.2 - genoma do segundo fago contra isolado A01-26.

5.10 RAPD fagos específicos

O RAPD realizado para os bacteriófagos específicos demonstraram grande polimorfismo entre os diferentes isolados. Diferentes padrões de bandas foram encontrados para os diferentes *primers* utilizados, com bandas variando entre 200 a 1.500 pb, e alguns isolados onde não houve amplificação para determinado primer. O primer OPL5 permitiu a obtenção de uma maior diversidade de bandas, sobretudo no

isolado 20, contra a bactéria A01-20, o que não é observado para o primer P2, o qual apresentou poucos ou nenhum sitio alvo de amplificação para alguns isolados avaliados (Figura 23).

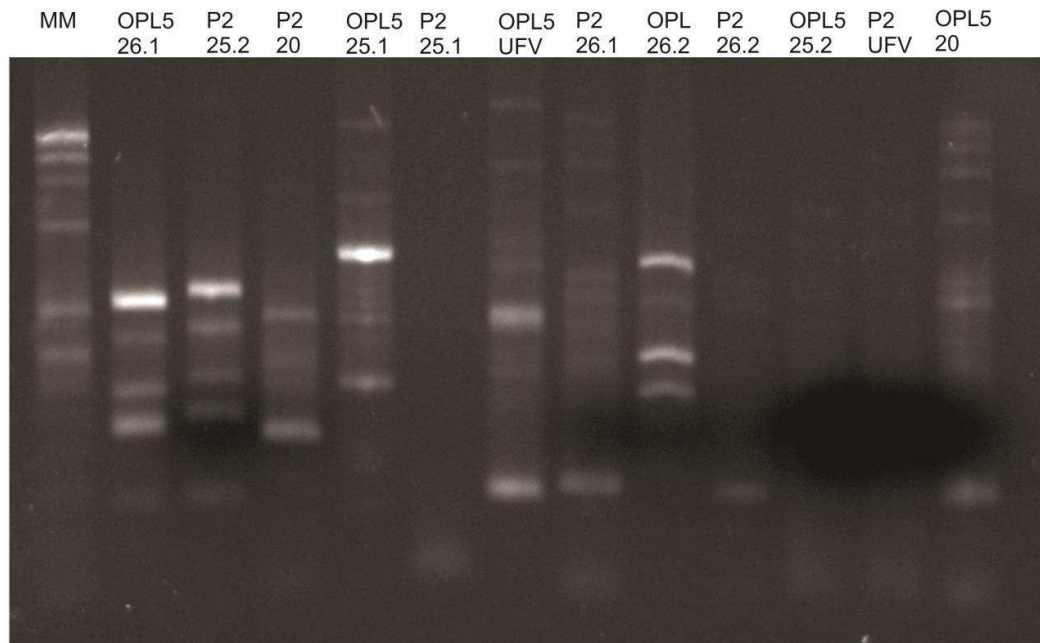


Figura 23 RAPD. São apresentados os perfis de amplificação para dois primers. É possível observar os diferentes perfis encontrados para o par de *primers*, para os diferentes isolados. MM- marcador de peso molecular 1 Kb (New England Biolabs Ltd. Canada); OPL5- genomas dos isolados amplificados utilizando o *primer* OPL5; P2- genomas dos isolados amplificados com o *primer* P2; 20- único fago isolado contra a bactéria *Azospirillum* sp.; 25.1- primeiro isolado contra a bactéria *Pseudomonas* sp.; 25.2- segundo isolado contra a bactéria *Pseudomonas* sp.; 26.1- primeiro isolado contra a bactéria *Brevundimonas* sp. e 26.2- segundo isolado contra a bactéria *Brevundimonas* sp..

Os bacteriófagos específicos contra as bactérias isoladas a partir da água de alimentação foram obtidos recentemente, o que impossibilitou uma melhor caracterização, bem como a avaliação dos mesmos no controle do biofilme.

6 Discussão

Neste trabalho buscamos avaliar a formação de biofilme em membranas de OR, isolar e caracterizar bacteriófagos específicos e não específicos além de avaliar sua ação sobre biofilmes formados por diferentes bactérias presentes na água de alimentação de sistemas de OR de refinarias de petróleo.

O biofilme formado na membrana de osmose foi avaliado quanto a sua estrutura pelo MEV e quanto à viabilidade celular nos diferentes níveis de profundidade pela microscopia confocal. Foi possível observar pelas micrografias obtidas a grande rugosidade presente em membranas de poliamida (Gu et al, 2013), nas quais haviam bastonetes aderidos já no terceiro dia. As bactérias do gênero *Sphingomonas* possuem morfologia de bastonete e são relatadas como pioneiras no processo de formação do biofilme em sistemas de OR (Bereschenko et al, 2010). No sétimo dia foi visível a presença de diversas microcolônias e uma fina camada de biofilme já estabelecido, com a presença de bactérias filamentosas, as quais são apontadas por Zhang et al (2011) como o principal grupo de bactérias em biofilmes de plantas de dessalinização de águas marinhas, além de bactérias isoladas, aderidas ao biofilme, demonstrando sua característica dinâmica (Zhang et al, 2011). A presença de um biofilme espesso pôde ser observada no 15º dia, com a presença de protozoários e sulcos, o que facilita a difusão de nutrientes, observações essas que corroboram com dados de Singh et al (2006).

A viabilidade celular do biofilme foi avaliada pela microscopia confocal, eleita a principal ferramenta de análise de biofilme por possibilitar que a análise seja realizada com a membrana ainda em estado hidratado (Carson et al, 2010; Donlan, 2002; Wang et al, 2012). Os resultados obtidos por confocal confirmam os resultados obtidos pelo MEV, dando informações adicionais com relação à viabilidade celular. Em todos os dias analisados pelo confocal, as células estavam viáveis, entretanto no 30º todas as células estavam mortas, nos diferentes campos focais, o que corresponde a diferentes profundidades do biofilme. Essa baixa viabilidade celular provavelmente é resultado da indisponibilidade de nutrientes após 30 dias de funcionamento do sistema, pois o permeado e o concentrado eram misturados e recirculados, fechando um esquema de retroalimentação.

Com o objetivo de isolar fagos contra bactérias formadoras de biofilme em sistemas de OR, foram isoladas duas bactérias halotolerantes pertencentes ao gênero

Arthrobacter, espécies *Arthrobacter soli* e *Arthrobacter nicotianae*, a partir de amostras de lodos ativados, etapa anterior à OR na planta de tratamento de efluentes em refinarias de petróleo. A presença de espécies do gênero *Arthrobacter* em sistemas de lodos ativados com altas taxas de compostos carbônicos é explicada por se tratar de um gênero com organismos comumente encontrados em solo, capazes de degradar compostos carbônicos inorgânicos, tais como atrazina e orgânicos como a piridina, podendo utilizar esses compostos como única fonte de carbono e nitrogênio (O'Loughlin et al, 1999; Sajjaphan et al, 2010). Utilizando as bactérias do gênero *Arthrobacter* foram isolados 4 bacteriófagos a partir dos lodos ativados da REGAP. A partir de análises morfológicas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e moleculares pela técnica de RAPD foi constatado se tratar do mesmo fago, denominado vB_AspP-UFV1, seguindo recomendação proposta por Kropinski et al (2009). Análises morfológicas mostraram se tratar de um fago da ordem *Caudovirales*, família *Podoviridae*, morfotipo C1 (Ackermann & Prangishvili, 2012). O fago apresenta dimensões reduzidas, com diâmetro médio de 30 nm, cauda curta com cerca de 5nm e cabeça icosaédrica de 25 nm, provavelmente devido ao reduzido genoma, com peso molecular de aproximadamente 22 Kb e composto por DNA. Alguns trabalhos relatam o isolamento de fagos da família *Podoviridae* possuindo enzimas depolimerases com ação sobre biofilmes bacterianos. Essas enzimas são utilizadas pelos fagos para acessarem receptores específicos na superfície bacterina (Glonti et al, 2010; Son et al, 2010).

As bactérias isoladas a partir da água de alimentação mostraram grande potencial de formação de biofilme. Do total de bactérias, 11 isolados: A01-02, A01-04, A01-07, A01-13, A01-14, A01-15, A01-20, A01-25, A01-26, A01-30 e A01-33, foram selecionados para avaliar a ação do fago vB_AspP-UFV1 sobre a formação do biofilme. O fago UFV1 mostrou atividade sobre 7 isolados dos 11 avaliados, o que corresponde a 63% do total, além de outros isolados onde é possível perceber a redução, entretanto essa não foi estatisticamente significativa, como o isolado A01-26. Todos os gêneros contra os quais o fago foi efetivo pertenciam ao filo das Proteobacterias, havendo membros da classe das alfa-proteobacterias (A01-15, A01-30 e A01-33), beta-proteobacterias (A01-02) e gamma-proteobacteria (A01-07, A01-14 e A01-25), o que demonstra especificidade do fago contra esse grupo taxonômico.

O fago UFV1 não foi lítico contra as bactérias avaliadas no ensaio de biocontrole do biofilme, dessa maneira, a efetividade na redução do biofilme é devido

ação de enzimas depolimerases ou pela infecção bacteriana sem que haja a lise celular. Bacteriófagos podem agir sobre o biofilme pela depolimerização de EPS, o que causa o colapso de todo biofilme formado (Cornelissen et al, 2011). Outra possibilidade é que a infecção sem lise celular cause a redução na adesão, uma vez que fagos podem interferir na aptidão de bactérias, pelo aumento ou redução na expressão de determinados genes, seja pela ação de fatores sigma fágicos ou pela expressão de proteínas com atividade desconhecida (Ainsworth et al, 2013; Chen et al, 2005; Schuch & Fischetti, 2009). Os diferentes graus de redução encontrados para as diferentes bactérias podem ser explicados por diferenças na composição química bem como por diferenças sutis nas concentrações bacterianas, uma vez que pequenos aumentos no inóculo resultam em aumento na densidade do biofilme (Creti et al, 2006; Extremina et al, 2011).

A infecção de células bacterianas por fagos no biofilme é extremamente condicionada por diversos fatores, incluindo a composição química do biofilme, condições ambientais (pH, temperatura, nutrientes) e outras características, tais como a concentração de fagos e especificidade (Sillankorva et al, 2004). Para a análise quantitativa indireta (CV) e estrutural (MEV) do biofilme após ensaios com bacteriófagos foram utilizados dois sistemas o MBEC e o alternativo. O sistema comercial MBEC[®] e o sistema alternativo foram utilizados a fim de observar respostas dose-dependentes com o aumento no número de partículas virais por número de células (MOI). Nestes ensaios foram utilizadas duas bactérias, a A01-25 e a A01-26, gêneros *Pseudomonas* e *Brevundimonas*, respectivamente. Nos ensaios realizados com tempo de 24 horas de contato entre o fago e a suspensão bacteriana, o isolado A01-26 apresentou resposta dose-dependente quando utilizado o sistema comercial, entretanto não há o mesmo padrão de resposta quando foi utilizado o sistema alternativo. As micrografias mostraram baixa adesão das bactérias às lamínulas utilizadas no sistema alternativo, quando comparada à adesão nos pinos do sistema MBEC[®]. Isso pode ser explicado pela preferência de bactérias aeróbias em se instalar e estabelecer biofilmes na interface líquido-ar (O'Toole, 2011), o que não é possível no sistema alternativo uma vez que a lamínula se encontra depositada no fundo dos poços, diferente do sistema MBEC[®], onde os pinos encontram-se fixados à tampa, disponibilizando a região para crescimento na interface líquido-ar. Outro fator que pode ter afetado os resultados obtidos é a superfície escolhida para o ensaio (Extremina et al, 2011), o que neste trabalho explica a menor adesão sobre as lamínulas quando comparado aos pinos de poliestireno, os quais

apresentam uma maior rugosidade quando comparada a superfície polida do vidro. Outras características como o meio de cultura utilizado e motilidade, podem estar relacionadas ao crescimento preferencial das bactérias na interface líquido-ar (Carson et al, 2010; Danese et al, 2000; O'Toole, 2011). Como o cristal violeta cora células mortas e vivas, por interagir com moléculas carregadas negativamente, presentes na matriz extracelular, os maiores valores absolutos de DO no sistema alternativo se devem à maior área de crescimento das lamínulas ($1,9 \text{ cm}^2$), quando comparadas à área de crescimento dos pinos do sistema MBEC ($1,08 \text{ cm}^2$).

Com objetivo de avaliar a influência do tempo sobre o biofilme formado, foram analisados por microscopia eletrônica de varredura o crescimento dos isolados A01-25 e A01-26 com 24 e 48 horas. Com menor tempo de incubação os resultados do MEV corroboram com os obtidos para o isolado A01-25 pela técnica do CV, não havendo diferença significativa na redução do biofilme com o aumento do MOI. Entretanto com 48 horas, ambos isolados apresentam uma redução dose dependente em resposta ao aumento do MOI. Como pode ser observado na figura 17, o isolado A01-25 apresenta poucas microcolônias com 24 horas de avaliação, entretanto com 48h, com maior biomassa, as diferenças se tornam mais acentuadas, e o padrão de redução dose-dependente pode ser observado. Com 48 horas, num MOI menor, é possível perceber a presença de fraturas na estrutura do biofilme, provavelmente devido à ação do fago sobre o EPS. Já o isolado A01-26 apresentou uma reduzida adesão celular sobre a superfície dos pinos em ambos os tempos de incubação. As diferentes modificações estruturais do biofilme à ação dos fagos sugerem se tratarem de dois modos diferentes de ação. A presença de enzimas fágicas agindo sobre os exopolissacarídeos no isolado A01-25 causou as fraturas observadas no biofilme, resultando em seu colapso (Cornelissen et al, 2011). Já a reduzida adesão do isolado A01-26, pode ser explicada pela infecção da bactéria sem que haja a lise, no entanto, a expressão de genes precoces do fago leva a modificações no padrão transcricional celular, impedindo que a bactéria transcreva genes relacionados à adesão (Ainsworth et al, 2013; Chen et al, 2005; Schuch & Fischetti, 2009).

Xiong and Liu (2010) destacaram que a característica de parasitas específicos dos fagos, acabariam por representar um desafio para a sua aplicação no tratamento de águas residuárias em grande escala, incluindo sistemas de osmose inversa. No entanto, Goldman et al (2009) observaram uma redução na adesão microbiana na superfície de

membranas de ultrafiltração após a adição de bacteriófagos específicos. A capacidade do fago UFV1 em reduzir a formação de biofilme na maioria dos isolados bacterianos testados, torna-o uma alternativa viável para o controle do biofilme no sistema de osmose inversa em estudo, entretanto para melhores resultados, foram isolados fagos líticos específicos, visando preparações de coquetéis fágicos (Fu et al, 2010; Hughes et al, 1998a), uma vez que enzimas presentes em fagos inespecíficos podem ser utilizadas na desestabilização do biofilme (Hughes et al, 1998a), permitindo que fagos específicos tenham acesso a seus hospedeiros no interior do biofilme. Para tanto, foram isolados 1 fago contra a bactéria A01-20 e 2 fagos contra as bactérias A01-25 e A01-26. Os genomas tratados com RNase foram submetidos a eletroforese para avaliação de sua composição, demonstrando ser composto de DNA. O perfil de bandas do RAPD mostrou se tratar de 5 diferentes bacteriófagos, sendo necessário a caracterização morfológica para identificação dos isolados, uma vez que a família é um dos parâmetros a serem levados em consideração na nomenclatura proposta por Kropinski et al (2009).

Os avanços na nossa compreensão dos diferentes mecanismos envolvidos na formação de biofilme, certamente irão fornecer informações cruciais e apoiarão a busca por novos compostos, visando a prevenção e o controle de incrustação em ambientes industriais. A utilização de fagos específicos contra bactérias conhecidas, presentes no biofilme, pode ser uma estratégia para o desenvolvimento do controle biológico baseado na utilização de fagos. Entretanto, uma vez que a especificidade dos fagos pode ser um problema, a descoberta de um fago com amplo espectro de ação na redução da formação de biofilme, pode representar um achado importante e entusiasmante.

7 Conclusões

Os resultados aqui obtidos nos permite concluir que:

- Os gêneros *Mycobacterium*, *Pseudomonas* e *Azospirillum* apresentaram maior potencial na formação de biofilme;
- O lodo ativado conferiu bacteriófagos inespecíficos com potencial de aplicação no controle da formação dos biofilmes;
- O sistema alternativo avaliado não se mostrou eficaz na avaliação de potenciais agentes no controle do biofilme;
- O bacteriófago vB_AspP-UFV1 foi eficaz na redução da formação de biofilme de 63% dos isolados analisados;
- O fago UFV1 apresentou ação específica para membros do filo das Proteobacterias;
- O tempo de formação do biofilme interfere na percepção do efeito dos bacteriófagos sobre o biofilme formado;
- Com 15 dias de funcionamento já existe um biofilme estabelecido sobre as membranas de osmose;
- Com 30 dias de funcionamento do sistema de OR piloto, o biofilme formado sobre a superfície da membrana não se encontra viável.

8 Perspectivas

Com o propósito de desenvolver uma metodologia que aumente a eficiência da utilização dos bacteriófagos nosso grupo busca o isolamento de bacteriófagos líticos, específicos contra as bactérias isoladas a partir da água de alimentação do sistema de OR, visando o uso de coquetéis contendo fagos específicos e não específicos e a avaliação da variação da diversidade microbiológicas por diferentes ensaios, como PCR em tempo real, hibridização fluorescente *in situ* - FISH e o Flow-FISH, em estudos conduzidos no sistema de osmose inversa.

9 Referências bibliográficas

Abedon ST, Thomas-Abedon C, Thomas A, Mazure H (2011) Bacteriophage prehistory: Is or is not Hankin, 1896, a phage reference? *Bacteriophage***1**: 174-178

Ackermann H, DuBow M. (1987) Viruses of Prokaryotes, Volume 1, General Properties of Bacteriophages. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Ackermann HW (1996) Frequency of morphological phage descriptions in 1995. *Archives of virology***141**: 209-218

Ackermann HW (1998) Tailed bacteriophages: the order caudovirales. *Advances in virus research***51**: 135-201

Ackermann HW, Prangishvili D (2012) Prokaryote viruses studied by electron microscopy. *Archives of virology***157**: 1843-1849

Ainsworth S, Zomer A, Mahony J, van Sinderen D (2013) Lytic infection of *Lactococcus lactis* by bacteriophages Tuc2009 and c2 triggers alternative transcriptional host responses. *Applied and environmental microbiology***79**: 4786-4798

Azari S, Zou L (2012) Using zwitterionic amino acid L-DOPA to modify the surface of thin film composite polyamide reverse osmosis membranes to increase their fouling resistance. *Journal of Membrane Science***401–402**: 68-75

Azari S, Zou L, Cornelissen E (2014) Assessing the effect of surface modification of polyamide RO membrane by L-DOPA on the short range physiochemical interactions with biopolymer fouling on the membrane. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces***120**: 222-228

Baker RW (2004) *Membrane technology and applications*, 2nd edn. Chichester ; New York: J. Wiley.

Bayer ME, Thurow H, Bayer MH (1979) Penetration of the polysaccharide capsule of *Escherichia coli* (Bi161/42) by bacteriophage K29. *Virology***94**: 95-118

Belgini DR, Dias RS, Siqueira VM, Valadares LA, Albanese JM, Souza RS, Torres AP, Sousa MP, Silva CC, De Paula SO, Oliveira VM (2014) Culturable bacterial diversity from a feed water of a reverse osmosis system, evaluation of biofilm formation and biocontrol using phages. *World journal of microbiology & biotechnology*

Ben-Sasson M, Zodrow KR, Gengeng Q, Kang Y, Giannelis EP, Elimelech M (2014) Surface functionalization of thin-film composite membranes with copper nanoparticles for antimicrobial surface properties. *Environmental science & technology***48**: 384-393

Bereschenko LA, Prummel H, Euverink GJ, Stams AJ, van Loosdrecht MC (2011) Effect of conventional chemical treatment on the microbial population in a biofouling layer of reverse osmosis systems. *Water research***45**: 405-416

Bereschenko LA, Stams AJ, Euverink GJ, van Loosdrecht MC (2010) Biofilm formation on reverse osmosis membranes is initiated and dominated by *Sphingomonas* spp. *Applied and environmental microbiology***76**: 2623-2632

BOARI CA (2008) FORMAÇÃO DE BIOFILME EM AÇO INOXIDÁVEL POR *Aeromonas hydrophila* E *Staphylococcus aureus* SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO.

Boari CA, Alves MP, Reis V, Savian TV, Piccoli RH (2009) Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. *Ciênc Tecnol Aliment***29**: 886-895

Calich VL, Kipnis TL, Mariano M, Neto CF, Dias da Silva WD (1979) The activation of the complement system by *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro: its opsonic effect and possible significance for an in vivo model of infection. *Clinical immunology and immunopathology***12**: 21-30

Carson L, Gorman SP, Gilmore BF (2010) The use of lytic bacteriophages in the prevention and eradication of biofilms of *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology***59**: 447-455

Carvalho CM, Gannon BW, Halfhide DE, Santos SB, Hayes CM, Roe JM, Azeredo J (2010) The in vivo efficacy of two administration routes of a phage cocktail to reduce numbers of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in chickens. *BMC microbiology***10**: 232

Chelme-Ayala P, Smith DW, El-Din MG (2009) Membrane concentrate management options: a comprehensive critical review A paper submitted to the Journal of Environmental Engineering and Science. *Canadian Journal of Civil Engineering***36**: 1107-1119

Chen Y, Golding I, Sawai S, Guo L, Cox EC (2005) Population fitness and the regulation of *Escherichia coli* genes by bacterial viruses. *PLoS biology***3**: e229

Chibeu A, Lingohr EJ, Masson L, Manges A, Harel J, Ackermann HW, Kropinski AM, Boerlin P (2012) Bacteriophages with the ability to degrade uropathogenic *Escherichia coli* biofilms. *Viruses***4**: 471-487

Clark JR, March JB (2006) Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials. *Trends in biotechnology***24**: 212-218

Coetser SE, Cloete TE (2005) Biofouling and biocorrosion in industrial water systems. *Critical reviews in microbiology***31**: 213-232

Cornelissen A, Ceysens PJ, T'Syen J, Van Praet H, Noben JP, Shaburova OV, Krylov VN, Volckaert G, Lavigne R (2011) The T7-related *Pseudomonas putida* phage phi15 displays virion-associated biofilm degradation properties. *PloS one***6**: e18597

Creti R, Koch S, Fabretti F, Baldassarri L, Huebner J (2006) Enterococcal colonization of the gastro-intestinal tract: role of biofilm and environmental oligosaccharides. *BMC microbiology***6**: 60

d'Herelle F (1917) Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *CR Acad Sci Paris***165**: 373-375

da Silva EP, De Martinis EC (2013) Current knowledge and perspectives on biofilm formation: the case of *Listeria monocytogenes*. *Applied microbiology and biotechnology***97**: 957-968

Danese PN, Pratt LA, Kolter R (2000) Exopolysaccharide Production Is Required for Development of *Escherichia coli* K-12 Biofilm Architecture. *Journal of bacteriology***182**: 3593-3596

Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science***280**: 295-298

Dias RS, Eller MR, Duarte VS, Pereira AL, Silva CC, Mantovani HC, Oliveira LL, Silva Ede A, De Paula SO (2013a) Use of phages against antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Journal of animal science***91**: 3930-3939

Dias RS, Eller MR, Salgado RL, da Silva CC, De Paula SO (2013b) THE USE OF PHAGE: THERAPY, BIOCONTROL AND COMMERCIAL MICROBIOLOGY. In *Bacteriophages: Biology, Applications and Role in Health and Disease*, Crosby CDaRJ (ed). New York: Nova Publishers

Donlan RM (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases***8**: 881-890

Donlan RM (2009) Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. *Trends in microbiology***17**: 66-72

Donlan RM, Costerton JW (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews***15**: 167-193

Duckworth D (1987) History and basic properties of bacterial viruses. *Phage Ecology*: 1-44

Eller MR, Dias RS, De Moraes CA, De Carvalho AF, Oliveira LL, Silva EA, da Silva CC, De Paula SO (2012) Molecular characterization of a new lytic bacteriophage isolated from cheese whey. *Archives of virology***157**: 2265-2272

Emmerich R, Löw O (1901) Die künstliche Darstellung der immunisierenden Substanzen (Nucleasen-Immunitätsproteine) und ihre Verwendung zur Therapie der Infektionskrankheiten und zur Schutzimpfung an Stelle des Heilserums. *Medical Microbiology and Immunology***36**: 9-28

Extremina CI, Costa L, Aguiar AI, Peixe L, Fonseca AP (2011) Optimization of processing conditions for the quantification of enterococci biofilms using microtitre-plates. *Journal of microbiological methods***84**: 167-173

Farias EL, Howe KJ, Thomson BM (2014) Effect of membrane bioreactor solids retention time on reverse osmosis membrane fouling for wastewater reuse. *Water research***49**: 53-61

Forsythe SJ (2013) *The microbiology of safe food*: John Wiley & Sons.

Fu W, Forster T, Mayer O, Curtin JJ, Lehman SM, Donlan RM (2010) Bacteriophage cocktail for the prevention of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on catheters in an in vitro model system. *Antimicrobial agents and chemotherapy***54**: 397-404

Ghosh A, Bindal R, Prabhakar S, Tewari P (2011) Composite Polyamide Reverse Osmosis (RO) Membranes—Recent Developments and Future Directions. *BARC Newsletter***321**: 43-51

Glonti T, Chanishvili N, Taylor PW (2010) Bacteriophage-derived enzyme that depolymerizes the alginic acid capsule associated with cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of applied microbiology***108**: 695-702

Goldman G, Starosvetsky J, Armon R (2009) Inhibition of biofilm formation on UF membrane by use of specific bacteriophages. *Journal of Membrane Science***342**: 145-152

Gu JE, Lee S, Stafford CM, Lee JS, Choi W, Kim BY, Baek KY, Chan EP, Chung JY, Bang J, Lee JH (2013) Molecular layer-by-layer assembled thin-film composite membranes for water desalination. *Advanced materials***25**: 4778-4782

Gutierrez D, Martin-Platero AM, Rodriguez A, Martinez-Bueno M, Garcia P, Martinez B (2011) Typing of bacteriophages by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR to assess genetic diversity. *FEMS microbiology letters***322**: 90-97

Hendrix RW, Smith MC, Burns RN, Ford ME, Hatfull GF (1999) Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage. *Proceedings of the National Academy of Sciences***96**: 2192-2197

Hoe S, Semler DD, Goudie AD, Lynch KH, Matinkhoo S, Finlay WH, Dennis JJ, Vehring R (2013) Respirable bacteriophages for the treatment of bacterial lung infections. *Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery***26**: 317-335

Hughes KA, Sutherland IW, Clark J, Jones MV (1998a) Bacteriophage and associated polysaccharide depolymerases--novel tools for study of bacterial biofilms. *Journal of applied microbiology***85**: 583-590

Hughes KA, Sutherland IW, Jones MV (1998b) Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: the role of phage-borne polysaccharide depolymerase. *Microbiology***144 (Pt 11)**: 3039-3047

Huq A, Whitehouse CA, Grim CJ, Alam M, Colwell RR (2008) Biofilms in water, its role and impact in human disease transmission. *Current opinion in biotechnology***19**: 244-247

Igunnu ET, Chen GZ (2012) Produced water treatment technologies. *International Journal of Low-Carbon Technologies*: cts049

Kang GD, Cao YM (2012) Development of antifouling reverse osmosis membranes for water treatment: A review. *Water research***46**: 584-600

Keller L, Surette MG (2006) Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nature reviews Microbiology***4**: 249-258

Kim HJ, Choi K, Baek Y, Kim DG, Shim J, Yoon J, Lee JC (2014) High-performance reverse osmosis CNT/polyamide nanocomposite membrane by controlled interfacial interactions. *ACS applied materials & interfaces***6**: 2819-2829

Kropinski AM, Prangishvili D, Lavigne R (2009) Position paper: the creation of a rational scheme for the nomenclature of viruses of Bacteria and Archaea. *Environmental microbiology***11**: 2775-2777

Lau W, Ismail A (2011) Progress in interfacial polymerization technique on composite membrane preparation. In *2nd International Conference on Environmental Engineering and Application*.

Lenski RE (1988) Dynamics of Interactions between Bacteria and Virulent Bacteriophage. *Adv Microb Ecol***10**: 1-44

Levin BR, Bull J (1996) Phage therapy revisited: the population biology of a bacterial infection and its treatment with bacteriophage and antibiotics. *American Naturalist*: 881-898

Loeffler JM, Nelson D, Fischetti VA (2001) Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science***294**: 2170-2172

Loessner MJ (2005) Bacteriophage endolysins--current state of research and applications. *Current opinion in microbiology***8**: 480-487

Lu TK, Collins JJ (2007) Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***104**: 11197-11202

Lu TK, Koeris MS (2011) The next generation of bacteriophage therapy. *Current opinion in microbiology***14**: 524-531

Malaeb L, Ayoub GM (2011) Reverse osmosis technology for water treatment: State of the art review. *Desalination***267**: 1-8

Malaeb L, Le-Clech P, Vrouwenvelder JS, Ayoub GM, Saikaly PE (2013) Do biological-based strategies hold promise to biofouling control in MBRs? *Water research***47**: 5447-5463

Merril CR, Biswas B, Carlton R, Jensen NC, Creed GJ, Zullo S, Adhya S (1996) Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *P Natl Acad Sci USA***93**: 3188-3192

O'Flaherty S, Ross RP, Coffey A (2009) Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria. *FEMS microbiology reviews***33**: 801-819

O'Loughlin EJ, Sims GK, Traina SJ (1999) Biodegradation of 2-methyl, 2-ethyl, and 2-hydroxypyridine by an *Arthrobacter* sp. isolated from subsurface sediment. *Biodegradation***10**: 93-104

O'Toole GA (2011) Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of visualized experiments : JoVE*

Oechslein F, Daraspe J, Giddey M, Moreillon P, Resch G (2013) In vitro characterization of PlySK1249, a novel phage lysin, and assessment of its antibacterial activity in a mouse model of *Streptococcus agalactiae* bacteremia. *Antimicrobial agents and chemotherapy***57**: 6276-6283

Pei R, Lamas-Samanamud GR (2014) Inhibition of biofilm formation by t7 bacteriophages producing quorum-quenching enzymes. *Applied and environmental microbiology***80**: 5340-5348

Pereira M (2001) Comparação da eficácia de dois biocidas (carbamato e glutaraldeído) em sistemas de biofilme.

Perez-Gonzalez A, Urtiaga AM, Ibanez R, Ortiz I (2012) State of the art and review on the treatment technologies of water reverse osmosis concentrates. *Water research***46**: 267-283

Pospiech A, Neumann B (1995) A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. *Trends in genetics : TIG***11**: 217-218

Rautenbach R, Rautenbach R, Albrecht R (1989) *Membrane processes*: Wiley.

Sajjaphan K, Heepngoen P, Sadowsky MJ, Boonkerd N (2010) *Arthrobacter* sp. strain KU001 isolated from a Thai soil degrades atrazine in the presence of inorganic nitrogen sources. *Journal of microbiology and biotechnology***20**: 602-608

Salahi A, Mohammadi T, Rekabdar F (2010) Reverse osmosis of refinery oily wastewater effluents. *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering***7**: 413-422

Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual (3-volume set)*, Vol. 999: Cold spring harbor laboratory press Cold Spring Harbor, New York:.

Schuch R, Fischetti VA (2009) The secret life of the anthrax agent *Bacillus anthracis*: bacteriophage-mediated ecological adaptations. *PloS one***4**: e6532

Sillankorva S, Oliveira R, Vieira MJ, Sutherland IW, Azeredo J (2004) Bacteriophage Phi S1 infection of *Pseudomonas fluorescens* planktonic cells versus biofilms. *Biofouling***20**: 133-138

Simões M, Simões LC, Vieira MJ (2010) A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology***43**: 573-583

Singh R, Paul D, Jain RK (2006) Biofilms: implications in bioremediation. *Trends in microbiology***14**: 389-397

Snyder L, Champness W (2007) *Molecular genetics of bacteria*, 3rd edn. Washington, D.C.: ASM Press.

Son JS, Lee SJ, Jun SY, Yoon SJ, Kang SH, Paik HR, Kang JO, Choi YJ (2010) Antibacterial and biofilm removal activity of a podoviridae *Staphylococcus aureus* bacteriophage SAP-2 and a derived recombinant cell-wall-degrading enzyme. *Applied microbiology and biotechnology***86**: 1439-1449

Spiegler K, Kedem O (1966) Thermodynamics of hyperfiltration (reverse osmosis): criteria for efficient membranes. *Desalination***1**: 311-326

Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW (2002) Biofilms as complex differentiated communities. *Annual review of microbiology***56**: 187-209

Sutherland IW, Hughes KA, Skillman LC, Tait K (2004) The interaction of phage and biofilms. *FEMS microbiology letters***232**: 1-6

Tanji Y, Hattori K, Suzuki K, Miyanaga K (2008) Spontaneous deletion of a 209-kilobase-pair fragment from the Escherichia coli genome occurs with acquisition of resistance to an assortment of infectious phages. *Applied and environmental microbiology***74**: 4256-4263

Twort FW (1915) AN INVESTIGATION ON THE NATURE OF ULTRA-MICROSCOPIC VIRUSES. *The Lancet***186**: 1241-1243

Waldor MK, Friedman DI, Adhya SL (2005) *Phages : their role in bacterial pathogenesis and biotechnology*, Washington, D.C.: ASM Press.

Wang R, Neoh KG, Shi Z, Kang ET, Tambyah PA, Chiong E (2012) Inhibition of Escherichia coli and Proteus mirabilis adhesion and biofilm formation on medical grade silicone surface. *Biotechnology and bioengineering***109**: 336-345

Weinbauer MG (2004) Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS microbiology reviews***28**: 127-181

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology***173**: 697-703

Wimpenny J (2000) An overview of biofilms as functional communities. In *SYMPOSIA-SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY*, pp 1-24.

Xiong Y, Liu Y (2010) Biological control of microbial attachment: a promising alternative for mitigating membrane biofouling. *Applied microbiology and biotechnology***86**: 825-837

Zhang M, Jiang S, Tanuwidjaja D, Voutchkov N, Hoek EM, Cai B (2011) Composition and variability of biofouling organisms in seawater reverse osmosis desalination plants. *Applied and environmental microbiology***77**: 4390-4398