

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

CAMILA DE SOUZA BRITO

**BACTERIÓFAGOS COM POTENCIAL DE APLICAÇÃO AO CONTROLE DE
BIOFILMES EM MEMBRANAS DE NANOFILTRAÇÃO**

BELO HORIZONTE
2022

CAMILA DE SOUZA BRITO

**BACTERIÓFAGOS COM POTENCIAL DE APLICAÇÃO AO CONTROLE DE
BIOFILMES EM MEMBRANAS DE NANOFILTRAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Vera Lúcia dos Santos

BELO HORIZONTE
2022

043

Brito, Camila de Souza.

Bacteriófagos com potencial de aplicação ao controle de biofilmes em membranas de nanofiltração [manuscrito] / Camila de Souza Brito. – 2022.
102 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Vera Lúcia dos Santos.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Filtração por Membranas. 3. Bacteriófagos. 4. Biofilmes. I. Santos, Vera Lúcia dos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE CAMILA DE SOUZA BRITO

Nº REGISTRO: 2020659233

Às 14:00 horas do dia **03 de novembro de 2022**, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Miriam Cristina Santos Amaral (Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental DASA / UFGM), Gabriel Magno de Freitas Almeida (Arctic University of Norway (Tromsø, Noruega) e a Profa. Dra. Vera Lúcia dos Santos (Orientadora), para julgar o trabalho final "**Bacteriófagos com potencial de aplicação ao controle de biofilmes em membranas de nanofiltração**", da aluna **CAMILA DE SOUZA BRITO**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Dra. Vera Lúcia dos Santos - Orientadora, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFGM e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 03 de novembro de 2022

Membros da banca:

Profa. Dra. Miriam Cristina Santos Amaral

Dr. Gabriel Magno de Freitas Almeida

De acordo:

Profa. Dra. Vera Lúcia dos Santos

(Orientadora)

Profa. Dra. Daniele da Glória de Souza

(Coordenadora do Programa de Pós-graduação)



Documento assinado eletronicamente por **Gabriel Magno de Freitas Almeida, Usuário Externo**, em 07/11/2022, às 04:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Gloria de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 10/11/2022, às 15:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Miriam Cristina Santos Amaral Moravia, Professora do Magistério Superior**, em 16/11/2022, às 09:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vera Lucia dos Santos, Servidor(a)**, em 22/12/2022, às 14:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1753842** e o código CRC **FF9FCBFA**.

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente pela a oportunidade de poder realizar mais este sonho!

A minha mãe, Aparecida, por ser exemplo de esforço e determinação. Por sempre me apoiar, incentivar, acreditar em mim e principalmente por não me deixar desistir dos meus sonhos, minha eterna gratidão, meu eterno e infinito amor!

Ao meu incentivador e grande amor, responsável por grande parte do meu equilíbrio emocional durante toda essa trajetória, Wesley. Obrigado por sempre me guiar para a luz no fim do túnel.

A professora Dra. Vera Lúcia dos Santos, por ter me acolhido em seu laboratório, pelos conselhos, tempo, dedicação, paciência, ensinamentos imensuráveis que ultrapassam as portas da academia e principalmente por ter me apoiado na decisão de conciliar as atividades do mestrado com vínculo empregatício. Sempre me lembrarei dos conselhos e do exemplo de profissional ímpar no qual me espelho e me espelharei por toda vida.

A todos os amigos do LMA, minha eterna gratidão por todo auxílio, pelos conselhos, aprendizados e principalmente pelas risadas que tornavam os dias difíceis, mais leves e divertidos.

A CAPES, Petrobrás e a UFMG por financiarem e possibilitarem a realização desta pesquisa.

COLABORAÇÃO

Prof. Dra. Vera Lúcia dos Santos, PhD.

LMA, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG.

CM, Centro de Microscopia da UFMG.

Departamento de Ciências da Vida - Contrastação negativa, UFMG



APOIO FINANCEIRO



RESUMO

Sistemas de membranas de nanofiltração têm sido utilizados em poços de exploração de petróleo com o intuito de diminuir as concentrações de sais e sulfato nas águas marítimas utilizadas nas injeções. No entanto, esses sistemas estão constantemente sujeitos a incrustações e corrosões decorrentes principalmente do crescimento microbiano e formação de biofilmes, o que leva a perda de eficiência e aumento dos custos com manutenção. A utilização de bacteriófagos para o controle microbiano apresenta hoje uma alternativa biotecnológica aplicável ao ambiente industrial. Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial de bacteriófagos no controle do crescimento microbiano e formação de biofilmes em sistemas de membranas de nanofiltração em unidade de remoção de sulfato (URS). Logo, em um primeiro momento 58 morfotipos de bactérias aeróbias presentes nos biofilmes das membranas foram isoladas quantificadas e realizada análise molecular para identificação. Destes, 35 foram identificados pela técnica de Maldi-TOF como pertencentes aos gêneros *Ochrobactrum*, *Brevibacillus*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Microbacterium*, *Lysinibacillus sp* e *Serratia* e usados em ensaios de controle microbiano em escala de bancada utilizando fagos pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMA) da UFMG. Esses fagos foram então testados quanto ao seu potencial bacteriolítico contra esses isolados e aqueles que apresentaram maior efetividade foram caracterizados em parâmetros *in vitro*. Para verificar a polivalência dos fagos, eles foram submetidos ao teste de espectro dos hospedeiros onde a maioria das linhagens bacterianas foram susceptíveis aos fagos testados. Cinco dos fagos da coleção apresentaram eficácia lítica frente à maioria das linhagens bacterianas. Contudo, os fagos 18C de *Pseudomonas aeruginosa* RLI17 e *Serratia marcescens* P1 RLI 33 se destacaram e seguiram para as demais caracterizações. Nos testes de avaliação das melhores razões de vírus/célula hospedeira, nomeada de multiplicidade de infecção (MOI), 18C apresentou maior atividade lítica na MOI de 10 para a maioria dos isolados expostos à infecção, com reduções superiores a 50%. O fago P1 causou infecção com a MOI de 0,01 em parte dos isolados, entretanto MOIs maiores também se destacaram para este fago. Quanto à estabilidade dos fagos a fatores físico-químicos (temperatura e pH), ambos mantiveram viáveis para os valores de pH que variaram do ácido ao básico e resistiram a temperatura máxima avaliada de 60°C. Por fim, foram realizados testes

para avaliar a atividade bacteriolítica dos fagos em membranas de nanofiltração, além de serem estáveis também em água do mar sintética. Ambos os fagos controlaram a maioria dos isolados bacterianos aos quais foram expostos, Conclui-se que os fagos avaliados se mostraram promissores e são bons candidatos para a terapia fágica em sistemas industriais.

Palavras Chaves: Membranas de nanofiltração, bacteriófagos, biofilmes, controle microbiano.

ABSTRACT

Nanofiltration membrane systems have been used in oil exploration wells in order to reduce the concentrations of salts and sulfates in sea water used in injections. However, these systems are constantly subject to fouling and corrosion mainly due to microbial growth and biofilm formation, which leads to loss of efficiency and increased maintenance costs. The use of bacteriophages for microbial control today presents a biotechnological alternative applicable to the industrial environment. In this context, the present work aims to evaluate the potential of bacteriophages in controlling microbial growth and biofilm formation in nanofiltration membrane systems in a sulfate removal unit (URS). Therefore, at first, 58 morphotypes of aerobic bacteria present in membrane biofilms were isolated, quantified and molecular analysis performed for identification. Of these, 35 were identified by the Maldi-TOF technique as belonging to the genera *Ochrobactrum*, *Brevibacillus*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Microbacterium*, *Lysinibacillus* sp and *Serratia* and used in microbial control assays on a bench scale using phages belonging to the collection of the Laboratory of Applied Microbiology (LMA) from UFMG. These phages were then tested for their bacteriolytic potential against these isolates and those that showed greater effectiveness were characterized in in vitro parameters. To verify the polyvalence of the phages, they were submitted to the host spectrum test where most bacterial strains were susceptible to the tested phages. Five of the collection's phages showed lytic efficacy against most bacterial strains. However, the 18C phages of *Pseudomonas aeruginosa* RLI17 and *Serratia marcescens* P1 RLI 33 stood out and went on to the other characterizations. In tests evaluating the best virus/host cell ratios, called multiplicity of infection (MOI), 18C showed the highest lytic activity at MOI of 10 for most isolates exposed to infection, with reductions greater than 50%. Phage P1 caused infection with an MOI of 0.01 in part of the isolates, however higher MOIs also stood out for this phage. As for the stability of the phages to physical-chemical factors (temperature and pH), both remained viable for pH values ranging from acidic to basic and resisted the maximum evaluated temperature of 60°C. Finally, tests were carried out to evaluate the bacteriolytic activity of the phages on nanofiltration membranes, in addition to being stable also in synthetic seawater. Both phages controlled most bacterial isolates to which they were exposed. It is concluded

that the evaluated phages showed promise and are good candidates for phage therapy in industrial systems.

Keywords: nanofiltration membranes, bacteriophages, biofilms, microbial control.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01: Etapas de tratamento da água de injeção em URS. A água do mar ao ser coletada por bombas centrífugas, é enviada para filtros tipo cesto para remoção de sólidos suspensos, após, segue para os filtros tipo cartucho o qual faz a remoção de parte do material orgânico. Em seguida, ela passa por bombas que elevam a pressão para níveis requeridos no sistema de nanofiltração para a remoção dos íons sulfatos. Nesse ponto, são injetados inibidores de incrustação. Em seguida, a água segue para as URS o qual é organizada em trens de membranas que realizam a filtragem de cerca de 75% do permeado que segue para desaeradores para retirada de oxigênio dissolvido. E por fim a água desaerada segue para injeção nos poços.	22
FIGURA 02: Dimensão relativa de diferentes solutos e comparação com a faixa de porosidade de membranas de MF, UF, NF e Ol.	23
FIGURA 03: Representação esquemática do processo de formação do biofilme. 1. Deposição e adesão dos microrganismos à superfície. 2 e 3. Adesão irreversível e produção da matriz polimérica. 4. Formação de microcolônias e maturação. 5. Desprendimento celular.	27
FIGURA 04: Processo de raspagem dos biofilmes associados aos módulos da membrana.	47
FIGURA 05: A: Ciclo da purificação, etapa de “spot” para definição da diluição em que foi possível a observação de placas de lises individualizadas. eu inverteria a ordem para ficar mais condizente com o texto e ordem da execução. B: Sobrecamada com a diluição escolhida mais bactéria-alvo e meio LB semissólido.	52
FIGURA 06: Placa com lise confluyente.	53
FIGURA 07: Caracterização de bacteriófagos quanto ao espectro de hospedeiro pela técnica de spot. A: <i>Ochrobactrum tritici</i> . B: <i>Ochrobactrum intermedium</i> . C: <i>Ochrobactrum anthropi</i> . D: <i>Serratia marcescens</i> . E: <i>Bacillus cereus</i> . F: <i>Bacillus sp.</i> G: <i>Lysinibacillus sp.</i> H: <i>Brevibacillus sp.</i> I: <i>Mycobacterium liquefaciens</i> .	64
FIGURA 08: Atividade lítica do fago 18C em diferentes MOIs frente a espécies bacterianas. A: <i>Microbacterium liquefaciens</i> AB2A. B: <i>Lysinibacillus sp</i> AA51. C: <i>Bacillus cereus</i> M4. D: <i>Brevibacillus choshinensis</i> BA56. E: <i>Ochrobactrum tritici</i> M3.	65
FIGURA 09: Atividade lítica do fago P1 em diferentes MOIs frente às bactérias: <i>Lysinibacillus sp</i> (AA51), <i>Ochrobactrum anthropi</i> (BA5), <i>Ochrobactrum intermedium</i> (BB51), <i>Bacillus sp.</i> (AB1) e <i>Serratia marcescens</i> (M8).	69

FIGURA 10: Análise da estabilidade a pH e temperatura utilizado teste estatístico Two-way ANOVA para análise de comparação das variáveis. a) estabilidade de pH do fago 18C; b) estabilidade de pH do fago P1; d) estabilidade a temperatura do fago 18C e) estabilidade a temperatura do fago P1.....73

FIGURA 11: Fago encontrado na amostra 18C durante a análise de TEM, a seta corresponde a localização da cauda não-contrátil.....78

FIGURA 12: Análise da diminuição do crescimento dos morfotipos bacterianos potencialmente formadores de biofilmes tratados com bacteriófagos. A) Morfotipos bacterianos tratados com o bacteriófago 18C; e b) morfotipos bacterianos tratados com o bacteriófago P1. Os resultados de cada tratamento compreende três replicatas e os asteriscos indicam diferença significativa pelo teste *t* quando comparados os valores de D.O_{600nm} de cada morfotipo bacteriano potencialmente produtor de biofilme após 24 horas de crescimento com o bacteriófago e o crescimento após 24 horas sem o bacteriófago (**; *** e **** indicam significância a 0,01% de probabilidade; 0,001% de probabilidade e 0,0001%, respectivamente). As barras indicam o desvio padrão.....79

FIGURA 13: a e b respectivamente: Fago encontrado na suspensão 18C durante a análise de TEM, a seta corresponde a localização da cauda não-contrátil.....81

Figura 14-a: Análise da diminuição do crescimento dos isolados bacterianos potencialmente formadores de biofilmes tratados com bacteriófagos por 24h. a) Isolados bacterianos tratados com o bacteriófago 18C. Os resultados de cada tratamento compreende três replicatas e os asteriscos indicam diferença significativa pelo teste *t* quando comparados os valores de D.O_{600nm} de cada bactéria tratada com o bacteriófago e sem o bacteriófago (**; *** e **** indicam significância a 0,01% de probabilidade; 0,001% de probabilidade e 0,0001%, respectivamente). As barras indicam o desvio padrão. 83

Figura 14-b: Análise da diminuição do crescimento dos isolados bacterianos potencialmente formadores de biofilmes tratados com bacteriófagos por 24h. b) isolados bacterianos tratados com o bacteriófago P1. Os resultados de cada tratamento compreende três replicatas e os asteriscos indicam diferença significativa pelo teste *t* quando comparados os valores de D.O_{600nm} de cada bactéria tratada com o bacteriófago e sem o bacteriófago (**; *** e **** indicam significância a 0,01% de probabilidade; 0,001% de probabilidade e 0,0001%, respectivamente). As barras indicam o desvio padrão. 84

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Atual classificação taxonômica do ICTV dos grupos de bacteriófagos até então descritos.....34

TABELA 2: Densidade de bactérias heterotróficas aeróbias (BHA) cm², associadas a biofilmes de módulos de uma Unidade de Remoção de Sulfato (URS). Sendo M módulo da membrana, E entrada da membrana, S saída da membrana 3 e 5 variações de locais da coleta.....59

TABELA 3: Identificação de bactérias da membrana pela técnica de Maldi-TOF Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - MALDI (Bruker, Alemanha).....60

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 Explorações de petróleo e o uso da água de injeção	19
2.2 Tratamentos da água de injeção	20
2.3 Membranas de nanofiltração	22
2.4 Biofilmes	24
2.4.1 Biofilmes em membranas de nanofiltração	28
2.4.2 Métodos de Controle de biofilmes em sistemas de membrana	29
2.5 Bacteriófagos	31
2.5.1 Classificação e identificação de fagos	33
2.5.2 Multiplicação de bacteriófagos	36
2.5.3 Aplicações de bacteriófagos e terapia fágica	38
2.5.4 Fatores que afetam a efetividade da fagoterapia	41
3. JUSTIFICATIVA	43
4. OBJETIVOS	46
4.1 Objetivo Geral	46
4.2 Objetivos Específicos	46
5. MATERIAIS E MÉTODOS	47
5.1. Quantificação e isolamento de bactérias associadas a biofilmes de membranas de nanofiltração	47
5.2 Identificação molecular dos isolados bacterianos	48
5.2.1 Identificação pela técnica de MALDI-TOF	48
5.2.2 Identificação por sequenciamento do gene rRNA 16S	48
5.2.2.1 Extração do DNA	48
5.2.2.2 Amplificação de regiões V1 a V5 do DNA ribossomal 16S	49
5.3 Bacteriófagos usados no estudo	50
5.3.1 Multiplicação de Bacteriófagos	52
5.3.2 Titulação de Bacteriófagos	53
5.4 Caracterização dos Bacteriófagos	54
5.4.1 Espectro/Especificidade dos hospedeiros	54
5.4.2 Multiplicidade de Infecção	54
5.4.3 Estabilidade a diferentes variações de pH	54

5.4.4 Estabilidade a variações de temperatura	55
5.4.5 Caracterização morfológica dos bacteriófagos por microscopia eletrônica de transmissão (MET)	56
5.5 Caracterização dos fagos quanto ao potencial bacteriolítico	57
5.5.1 Atividade bacteriolítica contra células planctônicas e prevenção da formação de biofilmes em membranas de nanofiltração	57
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
6.1. Quantificação, isolamento e identificação de bactérias heterotróficas aeróbias	58
6.1.1 Identificação pela técnica de MALDI-TOF	59
6.1.2 Purificação dos fagos	62
6.2 Caracterização dos bacteriófagos quanto ao espectro de hospedeiro, MOI, estabilidade a pH e temperatura, e caracterização morfológica por microscopia eletrônica de transmissão (MET).	62
6.2.1 Espectro de Hospedeiro	62
6.2.2 Avaliação da atividade bacteriolítica com diferentes MOIs	68
6.2.3 Avaliação da estabilidade dos fagos a diferentes variações de pH e temperatura	75
6.2.4 Caracterização morfológica por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	80
6.3 Avaliação do potencial bacteriolítico contra células planctônicas	82
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS DO ESTUDO	85
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
9. ANEXOS	100
9.1 Estoque de fagos do LMA em etapas de purificação e titulação	100

1. INTRODUÇÃO

A indústria petrolífera é um dos setores mais significativos para a economia mundial, pois além de alimentar as principais matrizes energéticas e gerar diversos produtos, a mesma também contribui para a geração de empregos e renda para o país. Entretanto, os gastos para a manutenção desse setor são elevados, principalmente quando se refere aos processos de exploração e produção do petróleo. Um dos desafios enfrentados pelo setor é o controle microbiano em seus processos, tendo em vista a presença desses microrganismos traz grandes impactos econômicos e ambientais.

A água do mar é comumente utilizada como fluido de injeção em plataformas *offshore* na recuperação secundária do petróleo. Porém, ela apresenta elevado teor de sais, partículas em suspensão e principalmente íons sulfato que causam diversos problemas, como a formação de precipitados que podem se depositar em diversas partes da plataforma de produção e resultar em incrustações. Além dos obstáculos relativos às incrustações, a presença de sulfato pode acarretar o crescimento de bactérias redutoras de sulfato (BRS), que produzem sulfeto de hidrogênio (H_2S). O H_2S é um agente extremamente tóxico e corrosivo e, quando presente, demanda etapas de tratamento adicionais no processamento do petróleo e do gás natural.

Para evitar tais problemas, a água do mar é tratada antes de ser injetada nos poços. O tratamento envolve a passagem por filtros grossos e finos do tipo cartucho para remoção de material particulado e em seguida pela dessulfatação em unidades removedoras de sulfato (URS) por processo de nanofiltração (NF). Em seguida, a água passa por etapa de remoção do oxigênio em torres desaeradoras, antes de sua injeção nos poços.

As membranas são estruturas filtrantes geralmente compostas por polímeros que apresentam forma, poros e tamanhos variados. Elas promovem a filtração utilizando diferenças de pressão como força motriz, em função da natureza e do tipo de soluto, e da presença ou não de partículas em suspensão. As mais comumente utilizadas nas URSs são as de nanofiltração. Membranas de osmose inversa também podem ser utilizadas nas unidades, elas são mais densas e foram desenvolvidas para reter sais e solutos com baixo peso molecular. Os sólidos suspensos e os microrganismos que não foram retidos pelo sistema de filtração inicial podem se

depositar sobre a superfície das membranas de NF, formando incrustações e biofilmes. Isso diminui a eficiência do sistema e reduz o tempo de vida das membranas.

Os biofilmes microbianos podem ainda causar problemas em campos petrolíferos, como a corrosão de reservatórios. Como consequência, prevenir o crescimento microbiano e formação de biofilmes é um aspecto fundamental para aumentar a eficiência e vida útil dessas unidades. O controle convencional é feito por meio do doseamento contínuo na água captada de inibidores de incrustação, biocidas, como o cloro e isotiazolinona ou 2,2- dibromo-3-nitrilo-propionamida (DBNPA) e ainda pela remoção de oxigênio da água antes ou após a URS. No entanto, esses tratamentos podem resultar em remoção incompleta dos microrganismos, principalmente pela baixa efetividade contra células associadas a biofilmes ou ocorrência de bactérias resistentes aos antimicrobianos. Além disso, os biocidas clorados podem causar danos às membranas de NF e gerar subprodutos como os trihalometanos, ácidos haloacéticos e N-nitrosodimetilamina, que são compostos tóxicos e com potencial carcinogênico.

Por esses motivos, novas abordagens baseadas em métodos físicos, químicos e/ou biológicos estão sendo avaliadas, visando à melhoria tanto em caráter econômico, associado ao aumento de eficiência e diminuição de danos a equipamentos, quanto ambiental. Dentre os métodos biológicos, o uso de bacteriófagos, vírus que infectam exclusivamente células bacterianas, constitui uma ferramenta promissora para o controle microbiano e consequente redução dos danos causados pela corrosão influenciada por microrganismos.

Alguns fagos apresentam ainda a capacidade de degradar a matriz de EPS que é a base da estrutura dos biofilmes e da proteção das células aos biocidas e outros estressores ambientais. O uso de fagos tem atraído atenção devido a algumas características que inclui, a não agressão ao meio ambiente e a não toxicidade a outros seres vivos devido à especificidade de hospedeiro; relativa facilidade de isolamento e caracterização; efeito lítico contra bactérias resistentes a biocidas; possibilidade de combinação de vários fagos ou deles com biocidas quando se deseja o controle de diversas espécies bacterianas e capacidade de persistir apenas enquanto houver bactérias viáveis para infecção, aumentando a segurança de uso e

ainda resultando na manutenção de títulos elevados em todo o sistema de tratamento com alta densidade bacteriana.

Diante disso, esse estudo tem por objetivos conhecer a diversidade microbiana e avaliar a presença de fagos em URS de uma plataforma de exploração de petróleo, bem como investigar o seu potencial de controle contra bactérias isoladas do sistema na forma livre e associada a biofilme. O estudo também objetiva fornecer informações úteis para traçar estratégias de monitoramento, gerenciamento e controle de biofilmes, corrosão e acidificação dos reservatórios, uma vez que estes danos causam consequências econômicas e ambientais.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Explorações de petróleo e o uso da água de injeção

O petróleo é um óleo de origem fóssil gerado a partir da decomposição da matéria orgânica a milhões de anos atrás, sua composição consiste em hidrocarbonetos e compostos orgânicos (Batista, 2011). Este óleo em conjunto com o gás natural é considerado um dos principais recursos naturais utilizados como fonte de energia, e pode ser encontrado em bolsões profundos em terra firme e em campos marítimos profundos, onde está a maior parte das reservas brasileiras (Petrobras, 2020; Batista, 2011). A exploração destes recursos consiste basicamente em três etapas - prospecção para localizar as bacias sedimentares, perfuração, que permite avaliar a presença de hidrocarbonetos no subsolo e por último, a produção do petróleo (Petrobras, 2020).

Durante a fase de produção ou recuperação primária do petróleo, são utilizadas fontes de energias naturais (tais como gás em solução, capa de gás, influxo de água, etc.) do próprio reservatório, que conduz o petróleo sob pressão até a superfície (Batista, 2013). Quando a pressão do reservatório se torna insuficiente para forçar o petróleo a subir, são aplicados métodos de recuperação secundária. Esses métodos viabilizam a produção através do fornecimento de energia externa para o reservatório na forma de injeção de fluidos que aumentam novamente a pressão (Silva, 2015).

Existem atualmente várias métodos para a recuperação secundária como métodos miscíveis de injeção de água do mar, de aquíferos ou água de formação, hidrocarbonetos ou CO₂; métodos térmicos com vapor d'água e água quente; e métodos químicos com injeção de polímeros, solução micelar e solução ASP (Álcali-Surfactante-Polímero) (Rosa, et al., 2006). Porém o mais comumente utilizado é o método de injeção de águas marítimas, devido a sua maior disponibilidade e fácil obtenção. No entanto, tendo em vista os aspectos econômicos e ambientais, a injeção da água de formação é a mais indicada (Batista, 2013).

A água de formação é encontrada nas rochas juntamente com o petróleo e o gás natural, e quando chega à superfície (através da recuperação primária) é denominada água de produção. Esta água, após passar por uma série de tratamentos, é injetada novamente nos reservatórios (recuperação secundária) (Veil

et al. 2004). A água de produção pode ser também oriunda de outros processos como condensação de gás injetado, e de tratamentos empregados durante a perfuração dos poços e produção do petróleo (Ekins et al. 2007).

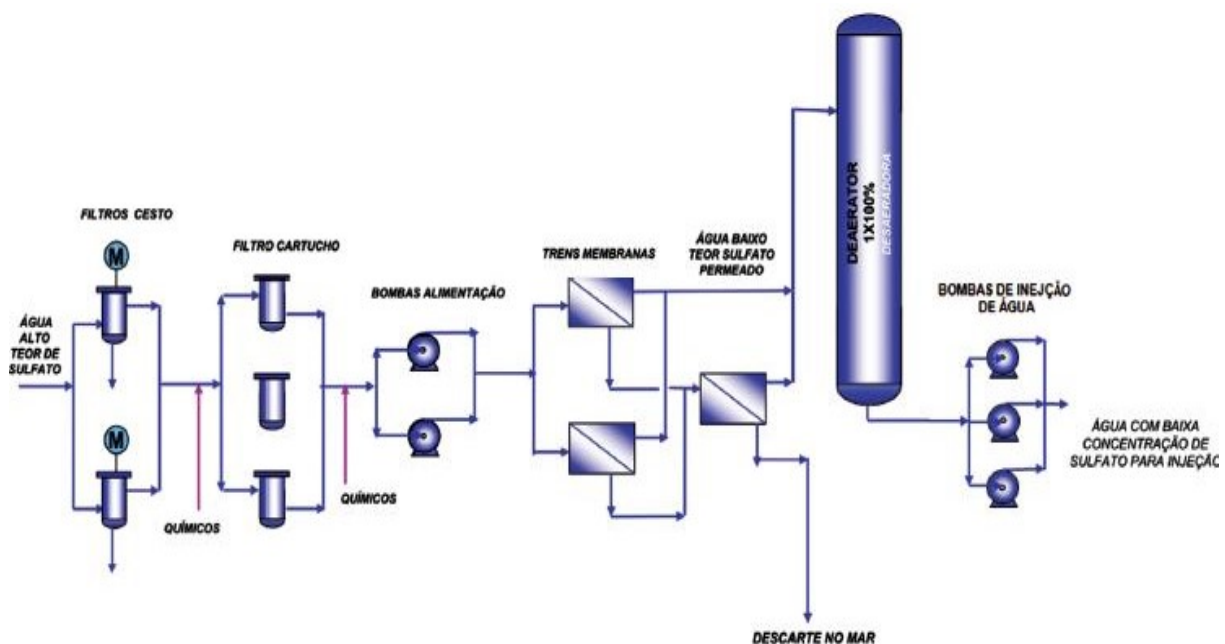
Contudo, um grande desafio associado à injeção de água, seja de produção, ou marítima para a recuperação secundária do petróleo, é a injeção de partículas sólidas que pode advir em conjunto com a água como, sais, microrganismos e outros compostos sólidos em suspensão (Souza, et al. 2010). Essas partículas podem levar à formação de incrustações e processos corrosivos, além de um fenômeno conhecido como *souring*. O *souring* é um dos principais problemas enfrentados pelas indústrias de petróleo durante o processo de exploração, e sua origem advém principalmente da injeção da água do mar. (Gieg, et al., 2011). As águas do mar contém um elevado teor de sulfato (em torno de 3000 mg L^{-1}) que, por ação de bactérias redutoras de sulfato (BRS), sofrem redução a sulfeto em condições anaeróbias, levando à acidificação dos reservatórios e à precipitação de sais, responsável pela corrosão de tubulações, membranas e equipamentos (Kremer, et al., 2019; Gieg, et al., 2011).

2.2 Tratamentos da água de injeção

O sistema de tratamento da água para injeção é composto da unidade de remoção de sulfato (URS) e do sistema de injeção de água (Iwaki, 2015). A água do mar é captada por meio de bombas centrífugas e enviadas para os filtros onde é realizada a filtração. Ainda na captação, a água é tratada com hipoclorito de sódio para eliminação de microrganismos. A filtração é realizada em duas etapas, com níveis diferentes. A primeira é composta por filtros grossos (tipo cesto), para remoção de sólidos suspensos e outros materiais menores que $25 \mu\text{m}$. Na segunda etapa, a água passa por filtros finos (tipo cartucho), que retém uma grande parte de material orgânico e sólidos suspensos de diâmetro menor que $5 \mu\text{m}$. Em seguida, a água passa por bombas que elevam a pressão para níveis requeridos no sistema de nanofiltração para a remoção dos íons sulfatos, de 25 a 28 bar (Legner, 2013). Nesse ponto, são injetados inibidores de incrustação, biocidas e sequestrantes de cloro. O inibidor de incrustação é usado para evitar a deposição de sais na superfície da membrana, enquanto o cloro, injetado em bateladas, também denominado de injeção de choque, visa reduzir o crescimento microbiano.

A Unidade de Remoção de Sulfato (URS) é organizada em “trens” contendo dois estágios cada. Por sua vez, em cada um dos estágios é recuperado 50% de permeado. O primeiro estágio possui cerca do dobro de membranas do segundo estágio. De toda água que entra no primeiro estágio, 50% atravessam a membrana e vão para o permeado. Os outros 50% que ficaram retidos no primeiro estágio, seguem para o segundo estágio de membranas. No segundo estágio, 25% do total da água que entra na URS passa para o permeado, formando um total de 75% de permeado. Os outros 25% que ficam retidos no segundo estágio são descartados no mar com teores de sulfato menores que 100 mg/L e uma pressão de cerca de 5 a 8 bar. Após esse processo, a água passa por desaeradores compostos por uma torre com sistema vácuo para retirada de oxigênio dissolvido. Nessa etapa, também são feitas periodicamente injeções de choque de biocida para evitar o acúmulo de microrganismos no recheio da torre. A água desaerada segue para injeção nos poços, como observado na figura 1 (Legner, 2013; Hupsel et.al., 2020).

Figura 1: Etapas de tratamento da água de injeção em URS. A água do mar ao ser coletada por bombas centrífugas, é enviada para filtros tipo cesto para remoção de sólidos suspensos, após, segue para os filtros tipo cartucho o qual faz a remoção de parte do material orgânico. Em seguida, ela passa por bombas que elevam a pressão para níveis requeridos no sistema de nanofiltração para a remoção dos íons sulfatos. Nesse ponto, são injetados inibidores de incrustação. Em seguida, a água segue para as URS o qual é organizada em trens de membranas que realizam a filtragem de cerca de 75% do permeado que segue para desaeradores para retirada de oxigênio dissolvido. E por fim a água desaerada segue para injeção nos poços.



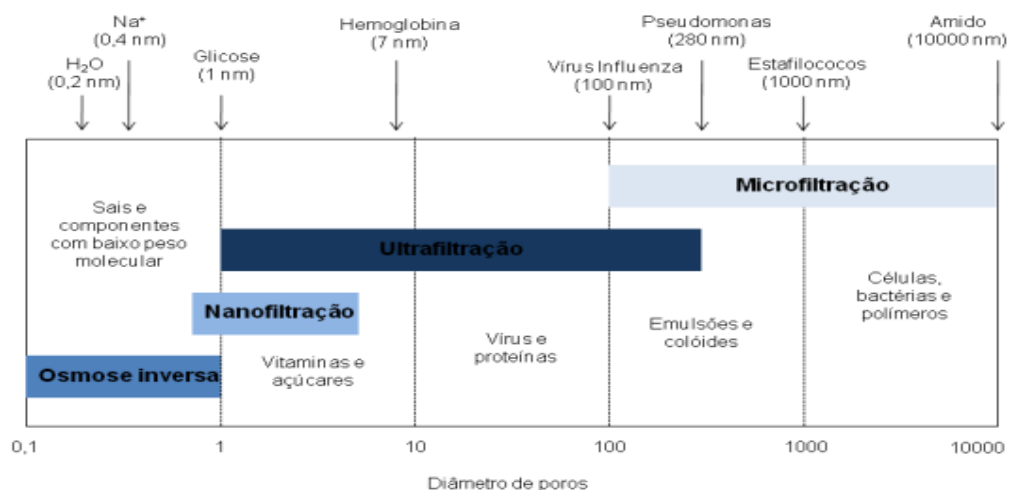
Fonte: Adaptado de Legner, 2013.

2.3 Membranas de nanofiltração

O uso da tecnologia de membranas vem ganhando grande destaque em suas aplicações sendo utilizadas para purificar diferentes fontes de água, incluindo águas residuais, águas superficiais, subterrâneas e marinhas. Esse processo tem como intuito promover a separação de partículas sólidas em suspensão de correntes líquidas ou gasosas. A membrana é uma barreira permeável seletiva que restringe a transferência de massa entre duas fases, e o que as diferenciam dos filtros convencionais é o alto poder de retenção, devido à presença de poros com dimensões variadas. Estes poros servem tanto para separar partículas como para fracionar moléculas de diferentes massas molares (Snatural, 2018).

Dentre as tecnologias por processo de separação líquida utilizando membranas, destacam-se quatro tipos: microfiltração (MF), que consiste na separação em fluxo cruzado (cross-flow) de baixa pressão de partículas coloidais e sólidas suspensas na água; ultrafiltração (UF), utilizada quando se deseja purificar e fracionar soluções contendo macromoléculas; nanofiltração (NF) que consiste no processo da difusão de algumas substâncias de origem orgânica e soluções iônicas; e osmose inversa (OI) que utiliza membranas semipermeáveis que retém principalmente o sal e componentes de baixo peso molecular (Snatural, 2018). As faixas de separação dos diferentes tipos de membranas estão apresentadas na figura 2.

Figura 2: Dimensão relativa de diferentes solutos e comparação com a faixa de porosidade de membranas de MF, UF, NF e OI.



Fonte: Nicolini, 2017.

As membranas realizam o processo de filtração utilizando diferenças de pressões como força motriz, em função da natureza e do tipo de soluto e da presença de partículas em suspensão (Nicolini, 2017). Dentre as membranas descritas acima, as de nanofiltração são normalmente as mais utilizadas em sistemas de tratamento que utilizam a água de injeção. Elas proporcionam a redução do teor de sulfato em águas marítimas, além de reter partículas de até 0,001 μm (Legner, 2013).

Membranas de osmose inversa também podem ser encontradas em URS, principalmente em unidades mais antigas que utilizam majoritariamente a água de produção como fluido de injeção (Legner, 2013). No entanto, elas vêm sendo

substituídas pelas membranas de nanofiltração, que possuem um menor consumo de energia e uma melhor estabilidade operacional, além de possuir uma taxa de recuperação de íons sulfato de 75% se comparada às de osmose inversa, que é de 50% (Legner, 2013; Guo, et al. 2020). Tecnologias que envolvem o uso de membranas de nanofiltração possuem uma variedade de aplicações para tratamento de água, sendo as mais notáveis remoção de matéria orgânica para fins de potabilidade, dessalinização de águas salobras, tratamento terciário de efluentes e remoção de íons sulfato em URS (Guo et al., 2020).

Entretanto, uma grande desvantagem associada ao uso de membranas de nanofiltração é a formação de incrustações (Guo et al., 2020). Essas incrustações causam um aumento de pressão exercida no sistema com consequente aumento do consumo de energia e comprometimento de desempenho ao longo do tempo. As principais causas de incrustações são depósitos de materiais inorgânicos e orgânicos, material particulado e coloidal e biofilmes microbianos (Oliveira 2007; Martin et al., 2011). Os diferentes tipos de incrustações podem se desenvolver simultaneamente e podem influenciar uns aos outros, como os íons sulfato, por exemplo, encontrados normalmente em águas marítimas. Este íon forma precipitados de sais em conjunto com outros íons como, cálcio, estrôncio e bário presentes na água do mar, além de favorecer o crescimento de BRS (Hupsel et al., 2020).

2.4 Biofilmes

Os biofilmes consistem em estruturas complexas formadas por comunidades polimicrobianas em superfícies bióticas ou abióticas em diferentes habitats (O'Toole et al., 2000). Esses microrganismos produzem e são envolvidos por uma matriz extracelular polimérica (EPS) constituída por polissacarídeos, proteínas, enzimas, fosfolípidos e ácidos nucleicos. Essa matriz atua como um filtro biológico que proporciona estabilidade mecânica e proteção contra alterações físico-químicas que ocorrem no meio, além de ser responsável pela estrutura e integridade do biofilme (Albuquerque et al., 2014; Rocha et al., 2018). Por ser altamente hidratada, a matriz também previne a dessecação do biofilme (Donlan, 2002).

No que diz respeito à composição dos biofilmes, a água é a fração mais significativa, podendo chegar a 97% da biomassa. Os microrganismos, por sua vez, compreendem uma pequena fração, cerca de 2% a 5% (Donlan, 2002). Os biofilmes podem ser compostos tanto por grupos taxonômicos diferentes de um mesmo grupo microbiano quanto por microrganismos de grupos distintos, como bactéria, fungos, algas, protozoários e vírus. Essa heterogeneidade proporciona uma diversidade de habitats, diferenças de composição de matrizes, espessura, compostos orgânicos e inorgânicos aderidos, bem como aumento da resistência a processos de desinfecção (Tarchitzky et al., 2013).

Nos biofilmes também podem ser observadas interações célula-célula devido a presença de canais que beneficiam a circulação de nutrientes de modo a prover fontes de carbono e energia para toda a microbiota associada. Essas interações microbianas são conhecidas como comensalismo e sintrofia, onde o produto do metabolismo de um grupo serve de substrato para outro e assim por diante (Poltak e Cooper, 2011). Desta forma, os biofilmes se caracterizam como estruturas dinâmicas dentro das quais as células se mantêm em constante alteração metabólica a depender da fase do biofilme (Simões et al., 2010).

Os microrganismos em biofilmes podem colonizar uma ampla variedade de superfícies, de origem biótica como órgãos e tecidos de animais e plantas, até as de origem abiótica, como próteses, superfícies metálicas e tubulações de sistemas de distribuição de água (Franco, 2013; Miranda, 2020). Os biofilmes podem apresentar diferentes formatos, dependendo das condições ambientais e do local em que estão inseridos, bem como a hidrodinâmica, disponibilidade de nutrientes e tipos microbianos que compõem sua estrutura (Oliveira et al., 2010). Como também podem estar envolvidos nos ciclos biogeoquímicos do carbono, nitrogênio, hidrogênio, enxofre, fósforo e da maioria dos metais, além de fazerem parte de biotecnologias usadas no tratamento de água potável por intermédio de filtros biológicos e de efluentes, como os biofiltros percoladores (Xavier et al., 2005).

Em relação à formação de biofilmes, trata-se de um processo dinâmico, complexo e altamente coordenado e regulado (Higa, 2020). O primeiro evento para o estabelecimento do biofilme é o condicionamento da superfície, no qual ocorrem alterações que tornam favorável a adesão e colonização microbiana, principalmente

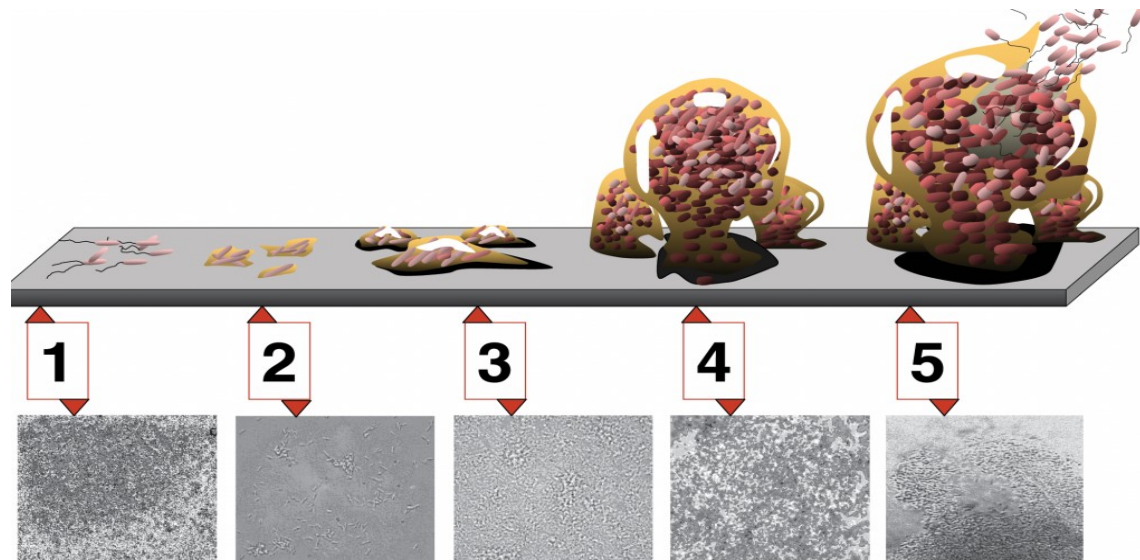
associadas a mudanças de polaridade e carga devido a deposição de partículas orgânicas gerais e compostos tensoativos (Simões et al., 2010; Gu e Ren, 2014). A etapa seguinte consiste na adesão reversível, onde os microrganismos planctônicos aderem à superfície através de estruturas de fixação como fímbrias, *pili* e flagelos, e se mantêm por meio de interações eletrostáticas, diferenças de potencial elétrico ou forças de van der Waals, que podem ser desfeitas pela força de cisalhamento, levando os microrganismos a deixarem a superfície e retornar ao estilo de vida livre planctônico (Najar, 2007).

O terceiro evento consiste no estágio irreversível, para estabilizar a fixação. Neste evento ocorre a transição de uma interação fraca da célula com o substrato para uma ligação permanente mediada por ligações covalentes e de pontes de hidrogênio entre componentes das superfícies microbianas e a superfície que está sendo colonizada (Stoodley et al., 2002).

Na quarta etapa, ocorre a multiplicação celular intensa e a ativa produção da matriz polimérica, bem como de moléculas de sinalização para manutenção do biofilme, a fim de estruturar e organizar o funcionamento da comunidade recém-formada. É nesta fase também que muitas células alteram seus processos fisiológicos nos diversos micro-habitats formados no biofilme, como exemplo, uso de vias metabólicas anaeróbias de produção de energia em condições de baixa tensão de oxigênio, entrar em estado de latência na ausência de nutrientes e presença de compostos tóxicos (Stoodley et al., 2002).

No quinto e último estágio, quando o ambiente não é mais favorável à manutenção do biofilme, as células se desprendem retornando ao estado planctônico, livres para colonizar novos ambientes (Higa, 2020; Donlan, 2002).

Figura 3: Representação esquemática do processo de formação do biofilme. 1- Deposição e adesão dos microrganismos à superfície; 2 e 3- Adesão irreversível e produção da matriz polimérica; 4- Formação de microcolônias e maturação; e 5- Desprendimento celular.



. Fonte: Adaptado de Higa, 2020.

Tanto o desprendimento de células ou agregados celulares da estrutura do biofilme como o desenvolvimento primário e maturação são dependentes da densidade populacional e sistemas de modulação da expressão gênica controlados por moléculas sinalizadoras em resposta a fatores ambientais. O mais compreendido é o sistema *quorum sensing* (Ng et al., 2012). Essa comunicação intercelular pode controlar eventos de transferência gênica horizontal, produção de fatores de virulência, expressão de mecanismos que conferem resistência aos antimicrobianos e produção de exopolissacarídeos, biossurfactantes e estruturas celulares relacionadas à formação de biofilmes. Além disso, alguns estudos têm demonstrado que os biofilmes podem atuar como reservatório de genes principalmente associados à resistência a antimicrobianos e a agentes químicos de desinfecção, os tornando menos suscetíveis à erradicação quando comparados aos mesmos microrganismos sob a forma planctônica (Chen et al., 2013). Alguns estudos têm relatado que bactérias presentes em biofilmes podem ser de 100 a 1000 vezes mais tolerantes a alguns antimicrobianos como os antibióticos e o cloro, se comparado a sua forma

planctônica (Yu et al., 2012). Essa tolerância pode estar associada a fatores que incluem desde a baixa atividade metabólica e limitações de oxigênio, até aumento nas taxas de mutações e transferência de genes de resistência e impedimento da entrada dos antimicrobianos imposta pela matriz do biofilme (Yu, et al, 2012 Nizer, et al, 2020). Tendo em vista essas questões, a formação de biofilmes dificulta o controle microbiano e se apresenta como um fator complexo, o qual pode gerar danos significativos no nível econômico, social e ambiental. Isto leva à busca por métodos de monitoramento e controle que visem impedir a adesão celular a superfícies e sua posterior colonização, bem como a busca por produtos que desestabilizem a matriz polimérica e eliminem os microrganismos envolvidos, sem gerar danos ao ambiente.

2.4.1 Biofilmes em membranas de nanofiltração

Embora sejam efetivos, os sistemas de membranas sofrem constantes obstruções ao longo do tempo de uso, o que reduz seu desempenho. Essas obstruções são resultado da adesão na superfície ou nos poros das membranas de partículas transportadas pela água, favorecendo o desenvolvimento e formação de incrustações, o qual é denominado *fouling* (Matin et al., 2011). As incrustações podem incluir substâncias inorgânicas (como precipitados de alguns sais e minerais), orgânicas (com deposição de ácido húmico e fúlvico), coloidais (deposição de partículas em suspensão como óxidos, detritos e sílicas) e microbiológicas (biofilmes microbianos, também denominado de *biofouling*) (Flemming, 2002; Oliveira, 2007; Matin et al., 2011). Dessas incrustações, o *biofouling* é o mais difícil de ser controlado devido a fixação irreversível dos microrganismos na membrana, associada a intensa multiplicação microbiana (Matin et al., 2011).

Contudo, nos sistemas industriais, tais incrustações podem ser controladas em etapas de tratamentos anteriores às membranas, mediante ajustes de pH e pela adição de anti-incrustantes e biocidas, conforme já mencionado (Fleming, 1997). O controle microbiano envolve ainda limpezas periódicas ou até mesmo a substituição das membranas para garantir a qualidade da água tratada (Flemming, 2002; Ponnusamy et al., 2010).

Um dos principais fatores que contribui para *biofouling* é a qualidade e composição da água que alimenta as membranas, como a presença de carbono,

nitrogênio e enxofre, as quais podem fornecer um ambiente propício para o desenvolvimento dos microrganismos (Shi et al., 2011; Zhou et al., 2020). Em ambientes marítimos, por exemplo, diferentes concentrações de sulfato, carbonato e ácidos orgânicos favorecem o crescimento de microrganismo diversos incluindo metanogênicos, redutores de sulfato, fermentadores e acetogênicos (Varjane et al., 2017), os quais podem formar biofilmes na membrana se não forem removidos nas etapas anteriores à filtração. Os sistemas de injeções de água também podem deslocar microrganismos de ambientes subterrâneos para ambientes superficiais e vice-versa (Varjane et al., 2017).

Dentre os microrganismos que podem promover a formação de *biofouling*, destacam-se os gêneros *Pseudomonas*, com a espécie *P. aeruginosa*, observada em biofilmes de membranas de nanofiltração, e *Escherichia*, que inclui a espécie *E. fergusonii*, que além de acometer as membranas, também possui potencial de degradação de hidrocarbonetos presentes no petróleo bruto de ambientes marinhos (Yu et al., 2012; Pasumarthi, et al., 2013). Grupos oxidantes de ferro, como o gênero *Acidithiobacillus*, e oxidantes de nitrito, como os *Nitrobacter*, também são encontrados, sendo este último utilizado como inibidor biológico de BRS e consequente controle de acidificação dos reservatórios (Zhou et al., 2020).

Microrganismos redutores de sulfato também são observados, com destaque para as BRS, principalmente associadas aos reservatórios de petróleo (Zhou et al., 2020; Li et al., 2017). As BRS estão envolvidas na maioria dos casos de biocorrosão, além de serem os principais microrganismos relacionados à formação de biofilmes nesses ambientes, sendo o gênero *Desulfovibrio* o mais frequentemente isolado (Santos et al., 2020; Varjane et al., 2017). I

2.4.2 Métodos de Controle de biofilmes em sistemas de membrana

O controle microbiano se inicia nas unidades de remoção de sulfato (URS) e envolve o pré-tratamento convencional das águas de injeção, com o uso de métodos físicos de limpeza e filtração, e químicos com a utilização de anti-incrustantes e biocidas.

O cloro é um biocida amplamente utilizado em processos industriais por ser um produto de baixo custo, eficaz e anti-incrustante. Pode ser usado na forma de cloro

gás (Cl_2), dióxido de cloro (ClO_2) ou hipoclorito de sódio (NaOCl). A ação biocida dos compostos clorados se dá pela formação de ácido hipocloroso (HClO), que tem alto potencial oxidante. Esse biocida age penetrando na parede celular e na membrana das células bacterianas por meio de difusão passiva, causando destruição e morte celular (Liu et al., 2011).

Alguns estudos têm mostrado a ação do cloro em biofilmes, que apesar de eficaz, quando presente em concentrações de baixa letalidade podem favorecer a seleção de bactérias resistentes ao biocida. Lin e colaboradores (2017) relataram que o uso de cloro em concentrações crescentes reduziram a biomassa microbiana em biofilmes formados por *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* e *Sphingomonas*, mas que 30 minutos após o tratamento, foram observadas multiplicação celular nos quatro biofilmes que persistiram, sugerindo uma adaptação bacteriana.

Novos métodos vêm sendo constantemente propostos e se mostrado promissores no controle de biofilmes, incluindo os métodos biológicos. Yeon e colaboradores em (2009) demonstraram o potencial uso de inibidores do *quorum sensing* (QS) no controle de biofilme. Eles mostraram efeitos positivos do uso de compostos análogos das moléculas sinalizadoras do QS, nomeadas de autoindutores, como furanonas halogenadas, e de enzimas que degradam lactonases e acilases no controle de biofilmes em membranas. Xu e Liu (2010) observaram que o desacoplador 2,4-dinitrofenol (DNP) tem potencial de uso no controle de biofilmes de membrana. Segundo os autores, esse composto interrompe a síntese de ATP, levando posteriormente a uma produção reduzida de AI-2, molécula de comunicação celular.

Outro método biológico promissor é o uso de enzimas hidrolíticas para degradação da matriz polimérica (Meireles et al., 2016). Enzimas como proteases, amilases, glicoamilases e celulasas atuam diminuindo a integridade física do biofilme por meio da quebra dos polímeros em monômeros, interferência na comunicação via QS ou, ainda, induzindo a lise celular (Cordeiro et al., 2011; Thallinger et al., 2013). Como as enzimas possuem especificidade quanto ao grupo de ligações químicas em que atuam, o sucesso para o controle do biofilme é dependente do conhecimento da composição da matriz polimérica dos biofilmes alvos para a escolha da enzima adequada. Outra abordagem é o uso de coquetéis enzimáticos de forma a obter a quebra dos diferentes polímeros que compõem a matriz e remoção completa do

biofilme (Lequette et al., 2010). Entretanto, as enzimas podem apresentar algumas limitações, como instabilidade em determinadas condições de temperatura e pH, podendo sofrer desnaturação, além da presença de inibidores que podem impedir suas atividades (Souza, 2017).

Outra alternativa se baseia no uso de bacteriófagos, vírus que infectam exclusivamente bactérias com potencial de lise das células planctônicas e sésseis, além de degradação da matriz polimérica do biofilme (Kaur et al., 2020).

2.5 Bacteriófagos

Bacteriófagos ou fagos são vírus que infectam seres procariontes. Esses organismos são parasitas intracelulares obrigatórios, ou seja, incapazes de se multiplicar fora de uma célula bacteriana, e por este motivo, são normalmente encontrados em ambientes onde seus hospedeiros estão presentes, o que inclui uma ampla variedade de habitats (Ackermann, 2007; Khal, 2016). Morfologicamente, a grande maioria dos fagos são compostos por um capsídeo protéico que pode ou não apresentar envelopes lipídicos. No interior do capsídeo, encontra-se o material genético, que pode ser circular, linear ou segmentado, dsDNA, ssDNA, dsRNA ou ssRNA (Madigan et al., 2010). Os fagos também apresentam capsídeos com simetria complexa, podendo ser estas icosaédricas, poliédricas, filamentosos ou pleomórficos (Hendrix, 2002; Ackermann, 2007). Além disso, a maioria dos fagos conhecidos possui uma cauda, sendo essa estrutura espiralada ou helicoidal, que pode apresentar fibras que contém proteínas de reconhecimento de receptores nas células bacterianas (Ackermann, 2007; Harada et al., 2018).

As primeiras pesquisas relacionadas a fagos foram referentes à natureza dessas partículas. No final do século XIX o químico inglês Hankin, relatou que a água dos rios Ganges e Jumna, na Índia, tinha uma ação bactericida acentuada, principalmente na espécie *Vibrio cholerae*. Foi demonstrado também que essa propriedade era filtrável e sensível à fervura (Vispo e Puchades, 2001). No início do século XX, Emmerich e Low descreveram uma substância capaz de causar lise na própria cultura de origem e em outras culturas bacterianas, além de possuir efeito curativo em infecções experimentais (Waldor et al., 2005). Mas somente em 1917, o canadense Félix d'Herelle, descreveu um organismo que lisava culturas bacterianas, o qual ele

denominou bacteriófagos ou fagos. Apesar de outros pesquisadores, como Ernest Hankin (1896) e Frederick Twort (1915) terem relatado observações semelhantes, eles não realizaram a categorização e descrição feitas por d'Hérelle (Vispo e Puchades, 2001). O Brasil também atuou como um dos pioneiros no uso de fagos, desempenhando um importante papel no início das pesquisas com a terapia fágica. José da Costa Cruz do Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil) foi o principal especialista na área, destacando-se com uso bem sucedido da terapia fágica para combater um surto de disenteria (Almeida e Sundberg, 2020).

Os bacteriófagos são organismos ubíquos e constituem o maior grupo de vírus conhecidos (Ackermann, 2007). Esses vírus têm sido úteis em diversas aplicações biotecnológicas, incluindo controle de infecções causadas por bactérias resistentes a antibióticos, diagnóstico de segurança alimentar e controle microbiano em indústrias, dentre outras (Harada et al., 2018). Estima-se que na natureza estes microrganismos compreendam uma grandeza de cerca de 10^{30} unidades de partículas virais. Eles podem ser encontrados em todos os ecossistemas, incluindo o organismo humano. Contudo, grande parte dos reservatórios desses vírus são os ecossistemas marinhos, atingindo densidades de até 10^8 vírus por mL, sendo os vírus com dsDNA os mais diversos e abundantes nesses ambientes (Dion et al., 2020; Breitbart et al., 2018). Um estudo realizado em regiões oceânicas mostrou, através de análises genômicas e microscopia eletrônica de transmissão, uma dominância de fagos dsDNA não caudados (cerca de 79%), seguidos de algumas famílias de fagos com cauda descritos na classificação taxonômica antiga (*Myoviridae*, *Podoviridae* e *Siphoviridae*), independente da profundidade. No entanto, na natureza, em geral, observa-se uma predominância de vírus caudados, cerca de 96% (Dion et al., 2020).

Os vírus em habitats aquáticos são responsáveis pela mortalidade de 20-40% de procariotos. Estima-se uma proporção de cerca de 10 unidades virais por cada célula bacteriana em águas marinhas (Breitbart et al., 2018). No entanto, estudos recentes usando metagenômica demonstram que essa razão vírus-hospedeiro pode variar de 1:100 (Dion et al., 2020). Esses fagos regulam as comunidades microbianas, devido ao efeito lítico e especificidade do hospedeiro, atuam como agentes da transmissão horizontal de genes e influenciam o ciclo dos nutrientes por meio da lise celular, principalmente o ciclo do carbono (Dion et al., 2020). Durante a lise da biomassa bacteriana, o *pool* de carbono orgânico total (COT) é convertido em

carbono orgânico dissolvido (COD), tornando-o novamente disponível como fonte de carbono e energia para as bactérias heterotróficas, etapa denominada de *loop* viral (Bhavsar et al., 2008). Desta forma, níveis tróficos superiores sofrem com a diminuição da transferência de carbono orgânico particulado (COP) entre os organismos em níveis inferiores (Bhavsar, et al. 2008).

2.5.1 Classificação e identificação de Bacteriofagos

Durante a redação da dissertação, foram usados extensivamente o site do ICTV (a versão "antiga") para garantir a exatidão das informações taxonômicas. No entanto, grandes mudanças ocorreram recentemente. No sistema taxonômico atual do ICTV (2022), a antiga ordem *Caudovirales*, o qual, era composto a maioria dos fagos conhecidos foi abolida, assim como, a dissolução das então famílias polifiléticas (*Myoviridae*, *Podoviridae* e *Siphoviridae*), sendo estas substituídas por novas famílias monofiléticas e permanecendo apenas informalmente como grupos não taxonômicos para classificação morfológica (morfotipos). Atualmente a maioria dos fagos pertencentes a antiga ordem *Caudovirales*, foram distribuídos em uma nova ordem *Crassvirales* e outras ordens foram estabelecidas (Dion et al., 2020; Javed et al, 2021; Adriaenssens et al., 2020; ICTV, 2022; Roumagnac 2022;).

Neste trabalho, a classificação taxonômica foi definida nos níveis de classe e família. A classe *Caudoviricetes* (proposta 2021.015B , ratificada em março de 2022), atualmente é composta por 19 famílias de bacteriofagos. A classe *Faserviricetes* composta por 3 famílias, classe *Tokiviricetes* composta por 2 famílias e as classes *Malgrandaviricetes* e *Tectiliviricetes* compostas por 1 família cada. Os grupos *Plasmaviridae*, *Fuselloviridae* e *Thaspiviridae*, foram atribuídos até o momento em nível de família (descrição na Tabela 1).

Tabela 1: Atual classificação taxonômica do ICTV dos grupos de bacteriófagos até então descritos.

Classe	Família	Estrutura	Material genético
<i>Caudoviricetes</i>	<i>Ackermannviridae</i>	Sem envelope, cauda longa contrátil Star-like, capsídeo icosaédrico, DNA linear	dsDNA
<i>Caudoviricetes</i>	<i>Autographiviridae</i>	Sem envelope, capsídeo icosaédrico, cauda curta, DNA linear	dsDNA
<i>Caudoviricetes</i>	<i>Chaseviridae</i>	Sem envelope, capsídeo icosaédrico cauda contrátil;	dsDNA
<i>Caudoviricetes</i>	<i>Demerecviridae</i>	Capsídeo icosaédrico, cauda flexível (representante colifago T5)	dsDNA
<i>Caudoviricetes</i>	<i>Drexelviriidae</i>	Sem envelope, capsídeo icosaédrico	dsDNA
<i>Caudoviricetes</i>	<i>Casjensviridae</i>	Cauda longa e não contrátil	dsDNA
<i>Caudoviricetes</i>	<i>Herelleviridae</i>	Sem envelope, cauda longa contrátil, capsídeo icosaédrico, DNA linear	dsDNA
<i>Caudoviricetes</i>	<i>Straboviridae</i>	Sem envelope, cauda longa contrátil, capsídeo icosaédrico, DNA linear	dsDNA
<i>Caudoviricetes</i>	<i>Guelinviridae</i>	Com caudas não contráteis e curtas	dsDNA
<i>Caudoviricetes</i>	<i>Kyanoviridae</i>	Cabeça alongada com cauda contrátil que termina em uma placa de base com fibras de cauda longa e curta	dsDNA
<i>Caudoviricetes</i>	<i>Mesyazhinovviridae</i>	Cauda flexível e não contrátil e capsídeo alongado	dsDNA
<i>Caudoviricetes</i>	<i>Orlajensenviridae</i>	Caudas não contráteis flexíveis; capsídeos isométricos.	dsDNA
<i>Caudoviricetes</i>	<i>Peduviridae</i>	Caudas longas contráteis com capsídeos icosaédrico	dsDNA
<i>Caudoviricetes</i>	<i>Vilmaviridae</i>	Caudas não contráteis flexíveis; capsídeos isométricos.	dsDNA
<i>Caudoviricetes</i>	<i>Zierdtviridae</i>	Caudas longas não contráteis com capsídeos	dsDNA

		isométricos	
<i>Caudoviricetes</i>	<i>Zobellviridae</i>	Capsídeo icosaédrico com cauda curta	dsDNA
<i>Caudoviricetes</i>	<i>Schitoviridae</i>	Capsídeos icosaédricos e caudas curtas não contráteis	dsDNA
<i>Caudoviricetes</i>	<i>Rountreeviridae</i>	Capsídeo isométrico, cauda dificilmente visualizada	dsDNA
<i>Caudoviricetes</i>	<i>Salasmaviridae</i>	Caudas curtas e capsídeos pequenos e alongados	dsDNA
<i>Faserviricetes</i>	<i>Inoviridae</i>	Com DNA circular: a- sem envelope, filamento longo . b- sem envelope, filamento curto.	ssDNA
<i>Faserviricetes</i>	<i>Plectroviridae</i>	Simetria helicoidal, DNA	ssDNA
<i>Faserviricetes</i>	<i>Paulinoviridae</i>	Filamentosos flexíveis não envelopados	ssDNA
<i>Malgrandaviricetes</i>	<i>Microviridae</i>	Sem envelope, capsídeo icosaédrico, DNA circular superenrolado.	ssDNA
<i>Tectiviricetes</i>	<i>Tectiviridae</i>	Sem envelope, capsídeo icosaédrico, vesícula lipídica, DNA linear	dsDNA
Sem classe definida	<i>Plasmaviridae</i>	Com envelope, lipídeos, pleomórfico, sem capsídeo, DNA circular	dsDNA
Sem classe definida	<i>Fuselloviridae</i>	Com envelope, lipídeos, pleomórfico, sem capsídeo, forma de limão, DNA circular	dsDNA
<i>Tokiviricetes</i>	<i>Rudiviridae</i>	Sem envelope, simetria helicoidal, como TMV, DNA linear	dsDNA
<i>Tokiviricetes</i>	<i>Lipothrixviridae</i>	Com envelope, simetria helicoidal, DNA linear	dsDNA
Sem classe definida	<i>Thaspiviridae</i>	Com envelope, cauda curta flexível em um pólo, capsídeo fusiforme, DNA linear	dsDNA

Fonte: Adaptado de Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), 2022

Visando compreender melhor a diversidade taxonômica de fagos, assim como sua importância ecológica nos ambientes nos quais se encontram, diversas metodologias moleculares têm sido utilizadas, como as que utilizam marcadores evolutivos para auxiliar na identificação e na avaliação da relação fago-hospedeiro (Clokier et al., 2011). No entanto, dado a ausência de um marcador genético

conservado e o elevado número de fagos no ambiente, os estudos de diversidade taxonômica são mais complexos (Dion et al., 2020; Clokie et al., 2011). Os marcadores em uso são genes que codificam a síntese da cauda e genes que codificam a síntese de proteínas estruturais (Zhong et al., 2002). Técnicas de “fingerprinting” usadas para diferenciar os fagos como as baseadas em padrões de restrição (RLFP) ou PCR-DGGE (Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante) também têm sido uma opção (Clokie et al., 2011).

A metagenômica também tem sido usada com sucesso na caracterização da diversidade de fagos (Breitbart et al., 2018). Esta metodologia avalia o genoma total dos vírus, podendo ser estes isolados de qualquer ambiente. Além disso, esta técnica tem como vantagem a possibilidade de conhecer uma gama de dados a respeito da comunidade viral, sem a necessidade da utilização de métodos baseados em cultivo (Dion et al., 2020). A abordagem permitiu a caracterização detalhada dos vírus dsDNA em oceanos, tanto em escalas locais como globais (Hurwitz et al., 2013).

Em 2014, um estudo realizado por Dutilh e colaboradores também resultou na descoberta do fago mais abundante no intestino humano, denominado crAssphage Kavagutti e colaboradores (2019) utilizando abordagem metagenômica, recuperaram mais de 2000 genomas de fagos completos incluindo pequenos “minifagos” e grandes “megafagos” em ambientes de água doce. Entretanto, uma desvantagem deste método para o estudo de fagos é que grande parte dos fagos preditos de existirem na natureza não foi isolada e ou descrita ainda. E com isso, grande parte dos genes analisados podem ser descritos como desconhecidos, por não estarem presentes nos bancos genômicos disponíveis. Com este intuito, é perceptível a necessidade de identificar e descrever novos genomas de fagos, como forma de se conhecer melhor suas relações com o hospedeiro e o ambiente.

2.5.2 Multiplicação de bacteriófagos

Os bacteriófagos assim como os demais vírus não possuem metabolismo próprio, e por esse motivo fazem uso da maquinaria da célula hospedeira para se multiplicarem (Rossi et al., 2010). O processo de multiplicação é composto por várias

etapas iniciando pela adsorção, que é composta por três fases: (a) contato inicial, (b) ligação reversível e (c) ligação irreversível (Kremmer et al., 2017). O ciclo se inicia através do reconhecimento primário, quando as partículas do fago são aderidas na superfície de seu hospedeiro bacteriano via difusão e movimento browniano. Após o contato inicial entre as partículas, o fago estabelece ligação reversível e inespecífica por meio de forças eletrostáticas. Seguida por uma ligação irreversível que ocorre através da especificidade entre proteínas do capsídeo da partícula do fago e receptores específicos na superfície bacteriana (Weinbauer, 2004)

Após a adsorção, ocorre a fase de penetração do vírus, que pode suceder das seguintes formas: (a) injeção do material genético, onde o fago contrai a cauda através da membrana bacteriana e injeta o ácido nucleico; (b) endocitose, onde os fagos são englobados pela membrana plasmática do hospedeiro e se alojam no interior de vesículas, que se fundem em endossomas que resultam na digestão do capsídeo viral e liberação do o ácido nucléico; e (C) por meio da fusão do envelope com a membrana celular, resultando na entrada da partícula inteira no citoplasma da célula bacteriana (O'Flaherty et al., 2009; Wittebole et al., 2013). Após a etapa de desnudamento, o material genético pode seguir dois caminhos, ser integrado ao genoma do hospedeiro ou permanecer livre no citoplasma. Ambas as possibilidades levam as células hospedeiras a produção de proteínas fágicas e consequente formação de novos fagos. Em seu hospedeiro, os fagos podem apresentar uma diversidade de ciclos de vida, sendo os mais comuns os ciclos lítico e lisogênico (Weinbauer, 2004). No ciclo lítico, também conhecido como via virulenta, os fagos direcionam a maquinaria da célula hospedeira para a produção de novas partículas virais. Após a adsorção, ocorre a replicação do genoma do fago no citoplasma do hospedeiro e a síntese de proteínas e enzimas virais para a montagem da estrutura viral e consequente lise da célula bacteriana (holinas e endolisinas) (Dąbrowska et al., 2005). Contudo as partículas virais podem também ser liberadas para o meio sem lisar a célula hospedeira, através do brotamento ou extrusão. Desta forma, a produção de vírus é mantida, sem provocar a morte do hospedeiro. Esse mecanismo é utilizado por alguns vírus caudados de dsDNA como exemplo, os fagos L3 (Drulis-Kawa et al., 2015).

No ciclo lisogênico, presente nos fagos temperados, o genoma viral é integrado ao genoma bacteriano, em um estado de latência (profago), e o material

genético do fago é replicado junto ao do hospedeiro, até que ocorra a indução do ciclo lítico por algum dano celular ao hospedeiro ou estresse associado a variações no ambiente (Weinbauer, 2004; Dąbrowska et al., 2005). Segundo Paul (2008), a via lisogênica é preferida durante os períodos de baixa abundância de hospedeiros e taxas de crescimento. Além disso, os profagos aumentam a sobrevivência de seus hospedeiros bacterianos em condições desfavoráveis por meio da diminuição de atividades metabólicas não essenciais ao hospedeiro.

Ademais, Yu e colaboradores (2015) mostraram que alguns fagos lisogênicos podem auxiliar a troca de genes de um hospedeiro para outro, contribuindo para a virulência das bactérias além da resistência a biocidas e antimicrobianos. Tais fagos atuam como vetores semelhantes aos plasmídeos, o genoma do fago é transmitido verticalmente quando a célula se divide ou transferido por transdução durante os ciclos de multiplicação dos fagos.

Em ambos os ciclos, após o fago ser liberado no meio extracelular, a partícula está apta a infectar novas células hospedeiras e iniciar um novo ciclo de multiplicação. Os bacteriófagos podem apresentar um baixo espectro de infecção, ou seja, infectar um hospedeiro específico (monovalentes), enquanto outros são de amplo espectro, o que significa que podem infectar múltiplas espécies bacterianas (polivalentes). Em ambiente oligotrófico, ou seja, com a disponibilidade de nutrientes reduzida, há o predomínio de polivalentes, visando garantir a sobrevivência da espécie, assim como a manutenção do ciclo lítico (Chibani-Chennouf et al., 2004).

2.5.3 Aplicações de bacteriófagos e terapia fágica

Os bacteriófagos foram utilizados como agentes terapêuticos logo após a sua descoberta, no início do século XX. O potencial terapêutico dos fagos foi então reconhecido, e logo em seguida aplicado por vários anos antes da descoberta e adoção dos antibióticos em meados da década de 20, e que levou ao declínio da terapia fágica (Lu e Collins, 2007; Lu et al., 2011). Outras razões também foram responsáveis pelo abandono da fagoterapia como a ambiguidade dos resultados gerados, a falta de conhecimento da especificidade do fago quanto ao hospedeiro, além das falhas nas técnicas empregadas (Vispo e Puchades, 2001). Entretanto, na década de 80, o aparecimento de bactérias multirresistentes aos antibióticos levou ao

retorno da fagoterapia como uma possível alternativa terapêutica nos países orientais. Enquanto isso, a vertente de países do ocidente era a busca por novos antibióticos (Weinbauer, 2004).

Nos últimos anos, houve um crescimento exponencial de estudos sobre fagoterapia. Os estudos têm destacado as características atrativas desses agentes, incluindo a especificidade de hospedeiro e alta capacidade de multiplicação. Além disso, os fagos são relativamente fáceis de isolar e propagar, e podem ser aplicados na forma de coquetéis, contendo diferentes fagos, podendo promover o controle de diferentes espécies microbianas, como também podem ser usados associados a outros agentes biocidas e são inócuos a animais e plantas (Konopacki et al., 2020).

A fagoterapia é aplicável a diferentes segmentos, como na medicina, sendo utilizados no controle de infecções por bactérias resistentes a antibióticos, ou em ação conjunta com esses quimioterápicos. Além disso, podem ter uso na produção de vacinas. Podem atuar como indicadores biológicos de qualidade de água (colifagos); na agropecuária, controlando patógenos de plantas e animais; e na indústria, atuando nos controles de biofilmes, principalmente em segmentos alimentícios e tratamentos que utilizam água em seus processos (Danis-Wlodarczyk et al., 2015).

O ramo da saúde é onde se concentra a maior parte das pesquisas relacionadas ao uso de fagos, principalmente de bactérias resistentes a antimicrobianos (Kremmer, 2017). A taxa de sucesso obtida do uso de fagos em pacientes, evidenciada pela recuperação parcial ou completa, chega a mais de 90% (Konopacki et al., 2020; Danis-Wlodarczyk et al., 2015). Harada e colaboradores (2018) avaliaram o uso de fagos no tratamento de infecções gástricas e pulmonares. Rubalskii e colaboradores (2020) também avaliaram o tratamento de infecção pulmonar causada pela bactéria *K. pneumoniae* em um indivíduo adulto via inalação de um coquetel de fagos durante um período de quatro dias. Após a terapia, a bactéria era indetectável nas lavagens brônquicas, mas permaneceu nas fezes do paciente. Um outro estudo avaliou o uso de um coquetel de quatro fagos via oral direcionados a *E.coli*, administrado em pacientes saudáveis por um período de 28 dias. Não foram observados efeitos adversos graves nos pacientes, embora tivesse reduções nas contagens fecais de *E.coli*, também não foram observados alterações na comunidade

microbiana intestinal sugerindo que os fagos podem alterar as espécies do microbiota alvo sem causar disbiose (Febvere et al., 2019).

A fagoterapia tem atraído interesse global e já é uma realidade aplicável em vários países. Organizações como o Instituto G. Eliava de Bacteriófagos, Microbiologia e Virologia (Tbilisi, Geórgia) e o Instituto Hirsfeld de Imunologia e Terapia Experimental (Wrocław, Polônia) tratam com sucesso infecções bacterianas desde meados do século XX, quando se propôs a terapia com fagos (Luong, 2020). Também já existem diversos produtos a base de coquetéis fágicos e enzimas produzidas por fagos, licenciados por órgãos reguladores comercialmente disponíveis, como exemplo o “Agriphage” desenvolvido pela Omnilytics utilizados na agricultura como agente bactericida dos patógenos *Xanthomonas campestris* e *Pseudomonas syringae*, responsáveis por causar manchas em plantações de tomate, pimenta e em alguns cultivos orgânicos (Harada et al., 2018); formulações para biocontrole de patógenos em indústrias de alimentos, como LISTEX (da Microcos Food Safety) para o controle de *Listeria monocytogenes* e o EcoShield (da Intralytix) para controle de *Escherichia coli* O157: H7. Além disso, existem patentes baseadas em aplicações de fagos na indústria do petróleo, mais especificamente para controle de BRS em reservatórios de petróleo e controle de biofilmes (Rodríguez-Rubio et al., 2016; Henry e Debarbieux, 2012).

Nos processos de filtração por membrana, os fagos podem ser aplicados no controle de biofilmes e ainda como indicadores de integridade da membrana (Wu et al., 2016). Goldman e colaboradores (2009) avaliaram a ação de bacteriófagos líticos específicos de *P. aeruginosa*, *A. johnsonii* e *B. subtilis* em sistemas de membranas de (UF) em escala de bancada. A aplicação dos fagos em uma concentração de 6×10^5 UFP / 100 mL resultou na redução de bioincrustação nas superfícies das membranas.

A eficácia dos fagos no controle de biofilmes é atribuída à capacidade de lise de células planctônicas, evitando a formação dos biofilmes, e de produção de enzimas capazes de hidrolisar a matriz polimérica do biofilme. Estas enzimas, como as despolimerases, agem rompendo a matriz de biofilmes potencializando o processo de infecção. Outra abordagem consiste no uso de enzimas líticas usadas pelos fagos no momento da infecção, como as VAPGHs, ou na liberação dos fagos das células ao

final do ciclo lítico, como as endolisinas (Moak e Molineux, 2004; Rodríguez-Rubio et al., 2013). As endolisinas, atuam em conjunto com as holinas rompendo a parede celular e lisando a célula hospedeira de dentro para fora. As endolisinas apresentam alta especificidade quanto à estrutura do peptidoglicano da célula hospedeira. Além disso, estudos afirmam que essa enzima é resultado da co-evolução fágica com seus hospedeiros (Drullis-Kawa et al., 2015). Sass e Bierbaum (2007) relataram a aplicação de duas endolisinas fágicas para a remoção do biofilme de *Staphylococcus aureus*.

Com o conhecimento sobre a ação enzimática dos bacteriófagos, muitas pesquisas têm dado enfoque no uso de fagos recombinantes para expressar proteínas destinadas a aumentar suas propriedades anti-biofilme. Lu e Collins, em 2007, realizaram um estudo de dispersão de biofilmes usando fago T7 de *E coli* expressando a enzima Dspb, a qual seria liberada no meio extracelular durante a lise bacteriana e hidrolisaria as adesinas necessárias para a formação de biofilmes. Já Gutiérrez e colaboradores (2015) avaliaram o uso de uma despolimerase denominada Dpo7 no fago philPLA7 isolado de *S. epidermidis*. A proteína degradou até 30% da matriz do biofilme formado por *S. aureus*.

Os fagos também são aplicáveis como indicadores biológicos de presença de patógenos, como os vírus entéricos humanos na produção de água potável e tratamento de águas residuárias (Branch et al., 2016). Essa aplicação se deve a sua semelhança com esses patógenos em termos de morfologia, tamanho, estrutura e composição, além de os fagos possuírem uma estrita correlação com as bactérias coliformes. As metodologias utilizadas para a sua detecção são rápidas e de baixo custo.

2.5.4 Fatores que afetam a efetividade da fagoterapia

Embora as técnicas baseadas em fagos sejam reconhecidas como soluções eficazes no controle de biofilmes e bactérias planctônicas, suas aplicações ainda dependem da definição de vários outros fatores.

Dentre estes fatores, destaca-se a alta especificidade do fago quanto a um hospedeiro, o que pode ser indesejável em algumas situações, como no controle de

espécies hospedeiras diferentes. Uma alternativa comumente utilizada é o uso de coquetéis de fagos, que amplia o espectro de infecção das cepas bacterianas alvos. Eydal e colaboradores. (2009) avaliaram o espectro de hospedeiro de 5 fagos pertencentes a antiga família *Podoviridae* de *Desulfovibrio aespoeensis* isoladas de amostras de água de diferentes poços de extração de petróleo. Eles avaliaram 5 espécies de *Desulfovibrio*, e somente uma delas, *D. aespoeensis*, foi infectada, revelando a especificidade parasita-hospedeiro. Fagos de espectro de hospedeiros ampliados, como os miovírus, também têm sido descritos (Luong et al., 2020). Gupta e colaboradores (2011) descreveram que um único fago foi capaz de lisar 17 de 28 isolados clínicos de *S. aureus*.

Considerando que os fagos podem apresentar características distintas quanto ao processo de infecção, a proporção de fagos adsorvidos pela célula hospedeira também é outro fator que deve ser levado em consideração. Essa razão é definida pela multiplicidade de infecção (MOI) e expressa o número de vírus que são adsorvidos por célula bacteriana durante a infecção. Variáveis ambientais dos locais de aplicação dos fagos também devem ser levadas em conta, tais como pH, temperatura (Sutherland et al., 2004).

Mecanismos de resistência bacteriana também podem influenciar na terapia fágica. Tais mecanismos incluem inibição da adsorção dos fagos nos receptores e bloqueio na inserção do material genético viral, restrição-modificação de DNA, mecanismo de CRISPRs (cas) e infecção abortiva (Kesik-Szeloch et al., 2013). A inibição da adsorção pode ocorrer devido a modificações nos receptores da célula hospedeira e produção de proteínas que mascaram os receptores de fagos bloqueando a entrada dos mesmos. Um exemplo é o sistema de exclusão de superinfecções (Sie) dependente de proteínas associadas à membrana que bloqueiam a entrada do DNA do fago no citoplasma da célula hospedeira por alterar a conformação estrutural das proteínas do local de injeção. Os genes codificadores dessas proteínas são encontrados geralmente em profagos que utilizam essa estratégia para evitar infecções subsequentes por outros fagos semelhantes (Labrie et al., 2010).

Outro mecanismo de resistência trata-se do sistema de restrição modificação (RM). Ele é um dos mecanismos mais estudados, pois está presente em praticamente

todas as células bacterianas conhecidas. Este sistema pode ser classificado em pelo menos quatro grupos (I,II,III,IV) e consiste na ação de enzimas endonucleases de restrição que clivam e degradam sequências específicas da molécula de DNA do fago não metilado. Em contrapartida, o DNA da célula hospedeira é protegido da degradação, devido à inclusão de um grupo metil na estrutura da molécula pela enzima metil-transferase (Kesik-Szeloch et al., 2013). No entanto, Bickle e Kruger (1993) demonstraram que esse mecanismo não funciona para alguns fagos como o T4, que contém em seu genoma a base hidroximetilcitosina (HmC) no lugar da citosina encontrada no genoma do hospedeiro. Esta modificação permite que o fago T4 não seja afetado pelo sistema (RM) que reconhece sequências específicas contendo uma citosina.

O CRISPR e seus genes associados (Cas) também é um método de resistência bacteriana, o qual compreende um sistema que codifica sequências específicas de materiais genéticos invasores como, genomas e plasmídeos e de fagos. O CRISPR consiste em um conjunto de sequências curtas de DNA bacteriano composta por repetições de nucleotídeos e que são separadas por sequências espaçadoras derivadas do material genético invasor. Após as sequências do sistema CRISPR serem transcritas em pequenos CRISPR de RNA elas servirão de reconhecimento caso haja uma invasão de DNA exógeno, além de atuarem como guias de orientação das endonucleases Cas, responsáveis pela clivagem da sequência invasora (BIKARD; MARRAFFINI, 2012). No entanto, alguns fagos como os fagos específicos de *S. thermophilus*, conseguem driblar este mecanismo por meio de mutações ou deleções pontuais nas sequências alvos correspondentes a sequências espaçadoras (Labrie et al, 2010).

Outro método de resistência refere-se à infecção abortiva (Abi), que consiste na ação de defesa das células. São produzidas pelas células hospedeiras diferentes proteínas que atuam em alvos distintos nas fases do ciclo viral (replicação, transcrição, síntese proteica e montagem), limitando a proliferação do fago, e como consequência, ocasionando a lise da célula hospedeira (Labrie et al., 2010).

Contudo, é perceptível que as terapias com fagos ainda requerem muitos estudos e cautela na sua utilização. No entanto, é notável o potencial de ação dos fagos em seus hospedeiros, além da existência de estratégias comprovadas de que

esses vírus usam para driblar os mecanismos de resistência do hospedeiro. Trata-se de um método promissor que deve ser pensado como uma tecnologia eficiente e segura.

3. JUSTIFICATIVA

A crescente demanda do setor petrolífero tem levado à busca de tecnologias que melhorem a eficiência, reduzam os custos e que não agredam o meio ambiente, e o uso de membranas de nanofiltração tem sido uma alternativa frequentemente empregada. No entanto, essas membranas estão constantemente sujeitas a processos de incrustações e corrosões decorrentes principalmente de contaminações microbianas com consequente formação de biofilmes. As bactérias que formam esses biofilmes, geralmente bactérias redutoras de sulfato (BRS), são encontradas naturalmente nos reservatórios de petróleo em unidades de remoção de sulfato (URS) ou introduzidas durante as operações. Os métodos de controle atuais utilizados pela indústria incluem a remoção física e tratamento com biocidas. Contudo, esses métodos possuem eficiência limitada, podem desgastar equipamentos, comprometer a saúde de quem os manuseia, causar danos ambientais, além de selecionar microrganismos resistentes, como bactérias do gênero *Pseudomonas sp*, que abriga patógenos de importância clínica que podem ser encontrados em sistemas de membranas.

O uso de bacteriófagos tem sido considerado uma alternativa inovadora de controle microbiano, tanto na forma planctônica como associada a biofilmes. O efeito destes fagos no controle de biofilme pode se dar de duas formas - indiretamente, ao lisar as células planctônicas que dariam origem a novos biofilmes e diretamente, ao degradarem as matrizes de EPS, destruindo os biofilmes já formados através de enzimas específicas. Ademais, o tratamento com fagos não demanda o uso de anti-corrosivos, necessários nos setores que fazem uso de biocidas oxidantes, para retardarem o seu efeito corrosivo; não exibem toxicidade a outros seres vivos; devido à especificidade do hospedeiro; não agredem o meio ambiente e não geram resíduos duradouros. Os fagos possuem capacidade de autorreplicação, que pode resultar em aumento da concentração ou manutenção das doses requeridas para o controle bacteriano ao longo do tratamento, sem necessidade de novas aplicações.

Entretanto, como já discutido anteriormente, alguns fatores como especificidade agente-hospedeiro a dificuldade da indução do ciclo lítico, bem como a necessidade de selecionar bacteriófagos que não estejam em lisogenia, além da resistência bacteriana, podem ser atribuídos como pontos negativos da utilização de fagos. Contudo, é perceptível que essas desvantagens estão sendo cada vez mais remediadas na medida em que novos conhecimentos sobre a relação fago-hospedeiro são gerados. A possibilidade da combinação bem planejada de fagos em formulações de coquetéis tem trazido benefícios que driblam sua especificidade. Esses benefícios incluem ampliação do espectro hospedeiro, direcionamento a vários alvos bacterianos de uma só vez, aumento da potência por múltiplos fagos atacando de uma só vez uma mesma célula, além da limitação da resistência, devido a necessidade de a bactéria alvo desenvolver resistência a vários fagos simultaneamente. Deve-se considerar também a possibilidade de combinações fágicas com outros agentes antimicrobianos e enzimas hidrolíticas já utilizadas para uso terapêutico. Os fagos, por sua vez, apresentam a possibilidade comprovada de se adaptar aos mecanismos desenvolvidos pelas bactérias como uma reação natural de evolução.

Com este intuito, este trabalho investigou o uso de fagos líticos como agente biológico viável para o controle microbiano de bactérias planctônicas associadas a biofilmes da membrana de nanofiltração, com o propósito de prevenir e evitar a formação de biofilmes. Sendo, portanto, uma possibilidade de redução de custos com produtos químicos e manutenção de equipamentos danificados por biocorrosão.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliação do potencial de bacteriófagos da coleção do Laboratório de Microbiologia Aplicada (UFMG) no controle do crescimento microbiano e formação biofilmes em sistemas de membranas de nanofiltração.

4.2 Objetivos Específicos

- Isolamento e identificação de bactérias heterotróficas aeróbias (BHA) presentes em amostras de biofilmes associados a membranas de nanofiltração.
- Análise de fagos da coleção do Laboratório de Microbiologia Aplicada (UFMG) quanto ao potencial bacteriolítico sobre BHA em estudo.
- Caracterização dos fagos quando ao espectro do hospedeiro, multiplicidade da infecção (MOI), estabilidade a fatores físico-químicos (pH e temperatura) e caracterização morfológica por microscopia eletrônica de transmissão (MET).
- Avaliação do potencial bacteriolítico dos fagos contra células planctônicas e prevenção da formação de biofilmes em membranas de nanofiltração.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Quantificação e isolamento de bactérias associadas a biofilmes de membranas de nanofiltração

Dois módulos de membranas de nanofiltração foram removidos de uma Unidade de Remoção de Sulfato (URS) localizada na plataforma P-56 em campo de Marlim Sul, na Bacia de Campos, Rio de Janeiro. As membranas foram removidas durante a parada do sistema para troca dos módulos pela equipe técnica da Petrobras, e transportados para o Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade Federal de Minas Gerais, para o isolamento de fagos e estudo da composição microbiana dos biofilmes associados às membranas.

Para a quantificação e isolamento das bactérias associadas ao biofilme, foi realizada a raspagem dos biofilmes de uma área correspondente a 30 cm² em quadruplicata com auxílio de um bisturi estéril (Figura 4). As amostras foram suspensas em solução salina (NaCl 0,85% m/v) e utilizadas na avaliação da densidade celular por unidade de área (UFC/cm²) e isolamento de bactérias heterotróficas aeróbias (BHA).

Figura 4: Processo de amostragem por raspagem dos biofilmes associados aos módulos da membrana.



Fonte: Acervo pessoal do autor.

Para o isolamento de BHA, as amostras de biofilmes suspensas em solução salina (NaCl 0,85% m/v) foram submetidas à diluição seriada (10^{-1} a 10^{-6}) e plaqueadas em meio Reasoner's 2A (R2A) (Dsyslab). Após incubação a 30 °C por até 48h, foi feita a enumeração (UFC/mL) e isolamento de representantes dos diferentes morfotipos, considerando as características macromorfológicas seguindo os parâmetros de cor, forma, elevação, borda, tamanho e superfície das colônias. Os isolados foram purificados e transferidos para microtubos contendo caldo nutritivo e glicerol 20% e estocados a -20 °C.

5.2 Identificação molecular dos isolados bacterianos

5.2.1 Identificação pela técnica de MALDI-TOF

As bactérias foram crescidas em meio Luria Bertani (LB) sólido (KASVI) por até 48h a 30 °C, e uma pequena porção da colônia transferida para poços da placa de aço inoxidável do Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - MALDI (Bruker, Alemanha). Em seguida, 1 µL de ácido fórmico (P.A.) foi adicionado às amostras, as quais foram mantidas à temperatura ambiente até secar. Os poços receberam 1 µL da matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA, Sigma-Aldrich, Polônia) e foram mantidas a temperatura ambiente até secar e então analisadas no espectrofotômetro de massa. Os espectros de massa obtidos foram analisados com o Software Bruker Daltonik MALDI Biotype (Bruker, Alemanha) e as identificações feitas com base em um ranque contendo as 20 melhores correspondências entre a amostra e o banco de dados, juntamente com o valor de confiança variando de 0 a 3. A identificação final foi feita de acordo com os critérios recomendados pelo fabricante. Esta técnica procedeu-se no Laboratório de Doenças de Animais Aquáticos (Aquavet) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFMG.

5.2.2 Identificação por sequenciamento do gene rRNA 16S

5.2.2.1 Extração do DNA

A obtenção do DNA total foi realizada utilizando o kit da Promega (Wizard Genomic DNA Purification Kit) seguindo as instruções do fabricante. Inicialmente foi centrifugado 1 mL das culturas bacterianas ($D.O_{600nm}$ 0,5) por 2 minutos a $14.0000 \times g$, e o sobrenadante descartado. Em seguida, na etapa de lise celular, o *pellet* foi ressuspendido em 600 µL de solução de lise, pipetando suavemente para misturar. As

amostras foram incubadas durante 5 minutos a 80 °C, e depois resfriados até a temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 3 µL de solução de RNase (4 mg/mL) e incubação a 37 °C durante 60 minutos. Para a precipitação de proteínas, adicionou-se 200 µL de solução de precipitação com homogeneização em vortex, seguido de centrifugação a 16.000 × *g* por 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 600µl de isopropanol (100%) em temperatura ambiente, e após, centrifugação numa rotação entre 16.000 × *g* por 3 minutos, o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspendido em 600 µl de etanol a 70% e centrifugado por 2 minutos numa rotação entre 13.000 a 16.000 × *g*. Em seguida, o etanol foi descartado e o precipitado deixado em temperatura ambiente para a secagem por 10 a 15 minutos. Por fim, o DNA precipitado foi reidratado em 50 µL de solução de reidratação por 1 hora a 65 °C. A qualidade da extração foi avaliada por eletroforese em gel de agarose e quantificada em nanodrop (Lite da Thermo Scientific) .

5.2.2.2 Amplificação de regiões V1 a V5 do DNA ribossomal 16S

Amostras de DNA extraídos foram utilizadas em reações de PCR para amplificação do marcador filogenético RNAr 16S, utilizando os primers 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 907R (5'-CCGTCAATTCMTTGTAGTTT-3'). As reações de PCR foram realizadas utilizando Kit PCR Master Mix Promega (Promega Corporation) em um volume total de 25 µL, seguindo o protocolo do fabricante. A amplificação foi realizada em termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 4 min, seguindo para 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento de 57 °C por 1 min, e extensão a 72 °C por 1 min e 30 s, finalizado por extensão final de 72 °C por 10 min. O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1%. Anteriormente à eletroforese, foram adicionados 4 µL de tampão de amostra Gel Loading Dye (Sinapse Biotecnologia) e 2 µL de GelRed® (Uniscience). No gel foram pipetados 5 µL do marcador de DNA de 1 Kb (DNA Ladder, Thermo Fisher) juntamente com 2 µL de GelRed® (Uniscience). A eletroforese foi realizada em tampão TBE 1X por 40 minutos a 110 volts. Ao fim, a observação do fragmento amplificado foi realizada utilizando fotodocumentador com luz UV (302 nm). O

material extraído foi armazenado a -20 °C, as etapas posteriores para o sequenciamento dos amplicons estão em andamento.

5.3 Bacteriófagos usados no estudo

Os bacteriófagos utilizados neste trabalho já tinham sido isolados em experimentos anteriores, e estocados no LMA. Tais fagos foram isolados de amostras de água coletadas na refinaria de petróleo REGAP/Petrobrás usando como hospedeiras as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* RLI17, *Serratia marcescens* PLA5, RLA12 e RLI33. Tal etapa foi realizada pela MSc. Raquel Antônia Barbosa como parte das atividades de sua dissertação de mestrado no Programa de Pós-graduação em Microbiologia (PPGM) do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. No estudo, as análises de microscopia eletrônica de transmissão das suspensões fágicas mostraram a presença de partículas com mais de uma morfologia. Assim procedemos com mais alguns ciclos de purificação dos fagos antes de seu uso.

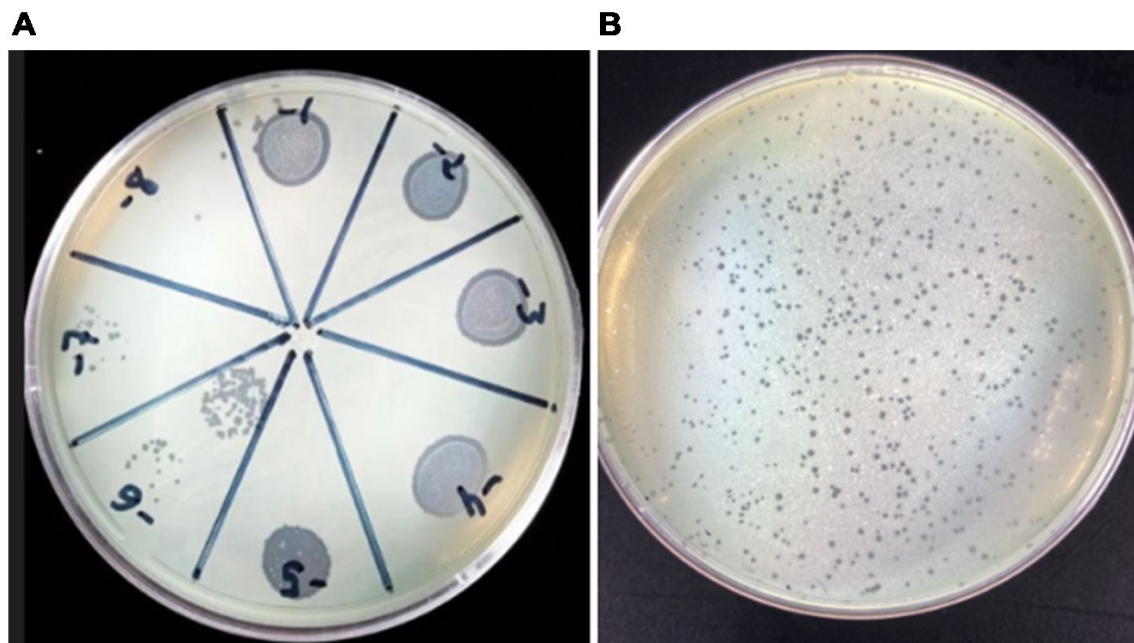
Para isso, as bactérias hospedeiras foram reativadas em meio LB por 19h. Em seguida, 0,1 mL das culturas foram transferidas para tubos tipo Falcon de 50 mL contendo 10 mL de LB adicionado de CaCl_2 5 mmol/L e 0,2% de glicose. O crescimento bacteriano foi acompanhado por medições de densidade óptica na absorbância de 600 nm ($\text{D.O.}_{600\text{nm}}$) em espectrofotômetro (modelo UV-Vis Shimadzu). Quando a densidade celular atingiu o valor de $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$ entre 0,3 a 0,5 os tubos receberam 200 μL da suspensão fágica e foram incubados por cerca de 16h em *shaker* (MA830-Marconi) a temperatura de 30 °C e agitação de 100 rpm. Em seguida, foram centrifugados por 10 minutos a $3000 \times g$. Os sobrenadantes filtrados em membranas de 0,22 μm para a remoção de células e *debris* celulares. Os filtrados obtidos foram submetidos a uma etapa de titulação usando o método de *spot*.

A primeira etapa da técnica de *spot* consistiu na realização de sobrecamada contendo a bactéria hospedeira em placas de poliestireno descartáveis contendo meio LB sólido (1,5% m/v de ágar) previamente preparadas. Cerca de 100 μL da bactéria com $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$ entre 0,3 e 0,5 foram misturados a 3 mL de meio LB semissólido (0,6% m/v de ágar) e após homogeneização, vertidos sobre as placas contendo o meio LB já solidificado. Após a completa secagem das placas, alíquotas de 10 μL das diluições

seriadas em solução salina (NaCl 0,85% m/v) nas proporções de 1:10 (10^1 a 10^{15}) das suspensões contendo bacteriófagos, foram aplicadas sobre a sobrecamada bacteriana. A placa de petri foi dividida com o auxílio de uma caneta própria para escrita permanente em aproximadamente oito blocos, para que várias diluições fossem aplicadas em uma mesma placa. O *spot* serviu para definir a diluição na qual seria possível observar placas de lise individualizadas (Figura 4-B).

Após definida a diluição em que foi possível a observação de placas de lise individualizadas, uma nova sobrecamada foi feita (Figura 4-B), mas dessa vez contendo alíquotas de 100 μ L do extrato na diluição escolhida, 100 μ L da bactéria-alvo em D.O._{600nm} entre 0,3 e 0,5, e 3 mL de meio LB semi-sólido fundido e resfriado a aproximadamente 45 °C. O conteúdo foi então vertido em placas contendo meio LB sólido. As placas foram incubadas a 34 °C por 16h e inspecionadas quanto à presença de placas de lise (Figura 4-A). Placas de lise com diferentes aspectos morfológicos foram recortadas da sobrecamada utilizando ponteira autoclavada e colocada em um microtubo contendo 1 mL de solução salina (NaCl 0,85% m/v), seguida de centrifugação a $3000 \times g$ por 10 minutos. O sobrenadante foi usado para a realização de novas diluições seriadas em solução salina (NaCl 0,85% m/v), submetidas a técnica de “*spot*”, conforme descrito acima (Figura 4-B). Para garantir a pureza da suspensão de bacteriófagos, ou seja, para que se possa afirmar que aquela suspensão contém apenas uma única morfologia de placa de lise, foram feitos ao menos quatro ciclos sucessivos. Cada ciclo foi, dessa forma, composto de uma etapa de “*spot*” para definição da diluição em que foi possível a observação de placas de lises individualizadas; sobrecamada com a diluição escolhida, bactéria-alvo e meio LB semissólido e recuperação de uma única morfologia de placa de lise. Uma vez obtidas as soluções contendo partículas fágicas puras, as partículas foram multiplicadas.

Figura 5: **A:** Ciclo da purificação, etapa de *spot* para definição da diluição em que foi possível a observação de placas de lises individualizadas. **B:** Sobrecamada com a diluição escolhida mais bactéria-alvo e meio LB semissólido.

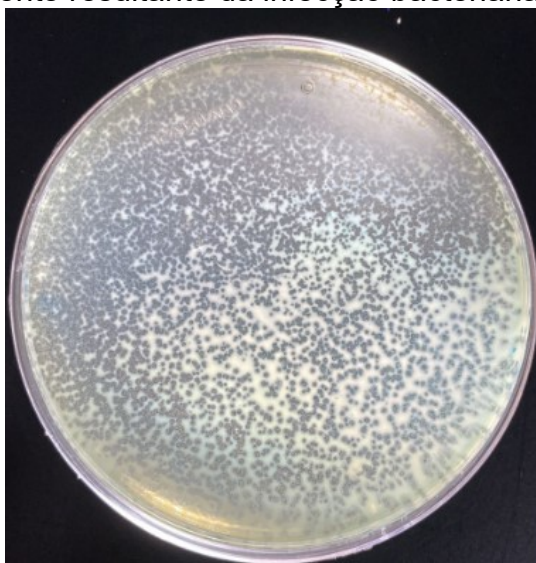


Fonte: Acervo pessoal do autor

5.3.1 Multiplicação de Bacteriófagos

A multiplicação consiste na obtenção de uma solução contendo alto título de bacteriófagos puros. Para isso, uma nova sobrecamada foi feita utilizando-se 100 μ L do sobrenadante da recuperação da placa de lise do último ciclo da etapa de purificação; 100 μ L da bactéria-alvo em D.O._{600nm} entre 0,3 e 0,5; e 3 mL de meio LB semi-sólido fundido, vertidos sobre o meio LB sólido de uma placa previamente preparada. Após a incubação a 34 °C por 16h e observada a obtenção de lise confluenta (Figura 6), 7 mL de tampão SM (5,8g de NaCl, 2g MgSO₄.7H₂O; 50 mL de Tris-HCl 1mol/L pH 7,5; 5 ml de gelatina 2%; e H₂O destilada para 1000 mL) foi adicionado sobre a placa. As placas foram incubadas a 34 °C sob agitação de 50 rpm por aproximadamente duas horas. Após esse período, com o auxílio de uma alça de *Drigalski* estéril, todo o meio semi sólido foi raspado e vertido em um tubo Falcon também estéril. O conteúdo obtido foi centrifugado a 4000 $\times$ g por 15 minutos e posteriormente filtrado utilizando uma membrana com 0,22 μ m de diâmetro de poro. O filtrado obtido foi titulado e refrigerado a 4 °C até o uso, e uma porção armazenada em glicerol a 20% (m/v) e estocada a -20 °C.

Figura 6: Placa de petri contendo uma sobrecamada com inóculo de 100µL da bactéria hospedeiro mais 100µL do sobrenadante da recuperação da placa de lise do último ciclo da etapa de purificação. Após o período de incubação foi possível se observar uma lise confluyente resultante da infecção bacteriana pelo fago em estudo.



Fonte: Acervo pessoal do autor

5.3.2 Titulação de Bacteriófagos

Os filtrados obtidos após a multiplicação dos bacteriófagos puros foram titulados como segue. A suspensão foi diluída serialmente em solução salina (NaCl 0,85% m/v) nas proporções de 1:10 até a ordem de 10^{15} e, pela técnica de *spot*, foi definida a diluição em que foi possível observar placas de lise individualizadas. Uma sobrecamada com a diluição escolhida foi feita visando obter uma placa em que fosse possível contar as placas de lise com número entre 30 e 300 para o cálculo das Unidades Formadoras de Placas (UFP) através da seguinte equação:

$$\text{UFP/mL} = (n \times \text{FD})/V$$

Onde: N é o número de placas de lises enumeradas; FD é o inverso da diluição na qual foi encontrado o valor de n; e V é o volume da suspensão de fago utilizado expresso em mL.

5.4 Caracterização dos Bacteriófagos

Os fagos purificados foram caracterizados quanto ao espectro de hospedeiro, MOI, estabilidade a pH e temperatura, e caracterizados morfolologicamente por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

5.4.1 Espectro/Especificidade dos hospedeiros

Para avaliar a especificidade dos hospedeiros, foi utilizada a técnica de *spot* em triplicata. Cada fago purificado foi testado para cada uma das bactérias isoladas. Uma alíquota de 100 μL de cada bactéria-alvo em D.O._{600nm} entre 0,3 e 0,5; e 3 mL de meio LB semi sólido fundido foram vertidos sobre o meio LB sólido de uma placa previamente preparada. Após solidificação do meio semi-sólido, alíquotas de 5 μL de cada fago purificado foram cuidadosamente depositadas sobre a superfície do ágar. Após secagem das gotas à temperatura ambiente, as placas foram incubadas a 30 °C por 16h. No dia seguinte, as placas foram avaliadas quanto à presença ou ausência de áreas claras, resultado da lise das células bacterianas pelos fagos.

5.4.2 Multiplicidade de Infecção

Multiplicidade de Infecção (MOI) é a razão entre o número de partículas do vírus e as células hospedeiras. Para estabelecer a melhor MOI, as bactérias alvos foram cultivadas em caldo LB a 30 °C até a densidade de 10^8 UFC/mL (D.O._{600nm} 0,3 a 0,5). Alíquotas de 450 μL de cada morfotipo bacteriano foram tratadas com fagos isolados em diferentes títulos variados em escala crescente a fim de se verificar a dinâmica de infecção (de 10^7 a 10^9 UFP/UFC, em placas de 48 poços). Os controles negativos consistiram em misturas contendo 250 μL das bactérias (10^8 UFC/mL) com 250 μL de tampão SM. As placas foram incubadas em Varioskan Lux Reader (Thermo Fisher Scientific Massachusetts, EUA) por cerca de 18h a 35 °C, e a densidade óptica D.O._{600nm} avaliada a cada 1h para determinação do MOI ideal, ou seja, o menor título de fago capaz de matar a maioria das bactérias. Esta foi usada nos experimentos subsequentes.

5.4.3 Estabilidade a diferentes variações de pH

O teste foi realizado conforme metodologia adaptada de Albino e colaboradores (2014). Alíquota de 100 μL de cada bacteriófago com título conhecido foi ressuspendida em 900 μL de solução tampão SM (5,8 g de NaCl, 2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 50 mL de Tris-HCl 1 mol/L pH 7,5) com diferentes variações de pH (3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0). Para obter as variações, alíquotas de solução ácida (HCL 0,1 mol/L) e solução básica (NaOH 2mol/L) foram gotejadas em 30 mL de tampão SM até obter o pH desejado. Para as medidas dos diferentes valores de pH foi utilizado PHmetro de

bancada (Micronal B474). A viabilidade dos fagos foi avaliada à temperatura ambiente e em triplicata após os intervalos de 1h, 2h e 3h. O controle consistiu das suspensões fágicas ressuspendidas em tampão SM com pH neutro nos mesmos intervalos de tempos em temperatura ambiente. Após cada intervalo de exposição, as suspensões foram tituladas pela técnica de *spot*, conforme descrito no tópico 5.3.2, para verificar se houve variação do título com a variação de pH. Para avaliar a significância dos fatores de variação, pH e tempo de exposição na viabilidade dos fagos, os resultados foram analisados pelo teste *Two-way* ANOVA usando o programa GraphPad Prism v.8 (GraphPad Prism, versão 8.0 San Diego, CA, EUA). As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

5.4.4 Estabilidade a variações de temperatura

Para o teste de estabilidade do fago frente a diferentes temperaturas, 1mL de cada fago, testado em triplicata, foi transferido para microtubos e incubados em termociclador (Applied Biosystems) em diferentes temperaturas (30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C). A viabilidade dos fagos foi avaliada após os intervalos de 1h, 2h e 3h. Após cada intervalo de exposição (1h, 2h e 3h), as suspensões foram tituladas pela técnica de *spot* até a ordem de grandeza do título inicial do fago, para verificar se houve variação do título.

Para avaliar a significância dos fatores de variação, temperatura e tempo de exposição, na viabilidade dos fagos, os resultados foram analisados pelo teste *Two-way* ANOVA usando o programa GraphPad Prism v.8 (GraphPad Prism, versão 8.0 San Diego, CA, EUA). As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

5.4.5 Caracterização morfológica dos bacteriófagos por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para a obtenção das imagens de bacteriófagos por MET, técnica que permite a caracterização e visualização das estruturas dos fagos para que possam ser

classificados, é necessária a obtenção de extratos com altos títulos ($>10^6$) e pureza, sem a presença de *debris* celulares (Ácts et al., 2020; Clokie & Kropinski, 2009).

Para produção de grandes volumes de suspensão de bacteriófagos, foi adotada a técnica de propagação em meio líquido. As bactérias-alvo para cada fago foram ativadas em meio mineral Bushnell-Hass, (BH) (DIFCO) pela transferência de culturas em crescimento exponencial ($D.O_{600nm}$ entre 0,3 e 0,5) para frascos tipo schott (250 mL) contendo meio líquido novo na proporção de 1:1000, ou seja, para cada 10 mL de meio de cultivo novo, foram adicionados 100 μ L de cultura. Em seguida, os frascos foram incubados a 34 °C sob agitação de 140 rpm por 16h. Após esse período, 500 μ L da suspensão do fago puro com título aproximado de 10^6 UFP/mL foram adicionados à cultura e novamente incubados a 34 °C sob agitação de 140 rpm e mantidos, dessa vez, por aproximadamente 24h ou até a observação de lise celular bacteriana completa, evidenciada pela limpidez do meio. O conteúdo foi centrifugado a $10000 \times g$ por 20 minutos em centrífuga refrigerada a 4 °C (Thermo Fischer Scientific, Heraeus Multifuge X3R, Alemanha). Após a centrifugação, o sobrenadante foi filtrado em membrana com 0,22 μ m de diâmetro de poro e a suspensão final, utilizada para os ensaios de concentração de fagos para microscopia.

Para a concentração de fagos, foi utilizada a técnica de ultracentrifugação em acetato de amônio (Clokie & Kropinski, 2009). A realização desse procedimento é importante para a remoção de lisados que contêm proteínas e outras impurezas, que causam interferência e manchas nas análises microscópicas. A purificação consiste em etapas de centrifugação (ultracentrífuga 70 – $80000 \times g$ por 3-6h) e lavagens. A suspensão pura de fagos com altos títulos (10^8 UFP/mL ou mais) foi centrifugada para sedimentação dos mesmos a $20000 \times g$ por 1h. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e substituído por solução de acetato de amônio 0,1 M, pH 7,0. O processo de lavagens e centrifugações foi repetido por mais duas vezes. O sedimento final foi armazenado em microtubo e encaminhado ao centro de microscopia da UFMG para a coloração e análise por microscopia.

5.5 Caracterização dos fagos quanto ao potencial bacteriolítico

5.5.1 Atividade bacteriolítica contra células planctônicas e prevenção da formação de biofilmes em membranas de nanofiltração

As BHA isoladas e identificadas foram reativadas em água do mar sintética com o objetivo de simular o ambiente natural desses microrganismos. Os constituintes da água do mar sintética foram descritos conforme metodologia adaptada por Kremer e colaboradores (2019) (NaF 0,015 g, $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,10 g, H_3BO_3 0,15 g, Na_2SO_4 20,0 g, CaCl_2 5,5 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 53,9 g, KBr 0,5 g, KCl 3,5 g, Na_2EDTA 0,0044 g, NaCl 117,5 g, NaHCO_3 1,0 g e extrato de levedura 0,2%). A solução foi preparada em um volume final de 5 L, e então filtrada em membrana de 0,22 μm . Após a reativação das BHA até observação de uma $\text{D.O}_{600\text{nm}}$ de 0,3, alíquotas de 5 mL de cada morfotipo foram inoculados em triplicata em placas para cultura de células (6 poços). As placas ainda foram acrescidas com uma membrana de nanofiltração limpa e estéril com aproximadamente 2 cm de diâmetro. Em seguida, foram adicionadas aos poços suspensões de cada bacteriófago já com valor da MOI estabelecido como descrito no item 5.5.2, visando avaliar se o fago era capaz de prevenir a formação de biofilme durante a infecção. O controle consistiu de 3 dos poços de cada placa não adicionados dos fagos. As placas foram então incubadas por 24h a 35 °C com agitação de 80 rpm (Marconi, Incubadora Refrigerada MA 830, São Paulo, Brasil). Em seguida, foram realizadas leituras da $\text{D.O}_{600\text{nm}}$ nos tempos de 0 e 24h, utilizando o equipamento Varioskan Lux Reader (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA).

Por fim, foi feita a contagem de UFC/mL e UFC/cm² através da técnica de microgota. O número ideal para a contagem situa-se entre 5 e 100 colônias por microgota. Em duplicata, as amostras foram diluídas serialmente até a ordem de 10^{10} e aplicadas em placas de meio LB sólido, sendo 3 gotas de 10 μL por diluição. As placas foram incubadas a 35 °C por 18h, com intuito de obter uma ou mais diluições em que fosse possível contar as colônias bacterianas isoladas. Após a contagem procedeu-se ao cálculo de UFC e da área total da membrana através das seguintes equações:

$$\text{UFC/mL} = n \times \text{FC} \times \text{FD}$$

onde:

n: É igual a média do número de colônias contadas por gota de cada diluição;

FC: É o fator de correção (número pelo qual o valor do inóculo utilizado deve ser multiplicado para que se obtenha 1 mL);

FD: É o inverso da diluição na qual foi encontrado o valor de n

$$A_{\text{Total da membrana}} \times \pi R^2 / \text{UFC/mL}$$

onde:

A_{Total da membrana} :É a distância em *cm* entre os raios da membrana

πR^2 : É a medida do raio ao quadrado

UFC/mL: É o número de unidades formadoras de colônias por mL

Para avaliar a significância das análises em ausência e presença de fago, os resultados foram analisados pelo teste *t*. usando o programa GraphPad Prism v.8 (GraphPad Prism, versão 8.0 San Diego, CA, EUA). As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Quantificação, isolamento e identificação de bactérias heterotróficas aeróbias

Foram observadas diferentes densidades bacterianas entre os módulos das membranas. No módulo 1, as bactérias heterotróficas aeróbias (BHA) variaram de $5,3 \times 10^4$ a $2,92 \times 10^5$ UFC/cm². Já no módulo 2, as variações foram de $2,7 \times 10^4$ a $3,4 \times 10^4$ UFC/cm². Essa diferença na densidade das BHA entre os módulos pode estar associada a diferenças nas condições físico-químicas entre os diferentes pontos de coleta nas membranas. De fato, essas condições podem variar entre plantas da membrana, bem como entre diferentes módulos da membrana dentro do mesmo vaso de pressão (Nagaraj et al., 2017).

Tabela 2: Densidade das bactérias heterotróficas aeróbias (BHA) por cm^2 , associadas a biofilmes de módulos de uma Unidade de Remoção de Sulfato (URS). Sendo M o módulo da membrana; E, a entrada da membrana; S, a saída da membrana; os números 3 e 5 indicam a distância em cm do centro da membrana para o ponto de coleta.

Pontos	BHA (UFC/ cm^2)
M1E3	$2,92 \times 10^5$
M1E5	$4,8 \times 10^5$
M1S3	5×10^5
M1S5	$5,3 \times 10^4$
M2E3	$3,2 \times 10^4$
M2E5	$3,4 \times 10^4$
M2S3	$2,7 \times 10^4$
M2S5	$3,3 \times 10^4$

6.1.1 Identificação pela técnica de MALDI-TOF

Cerca de 58 morfotipos de BHA foram isolados e caracterizados quanto aos seus aspectos macromorfológicos. Destes, 35 foram identificados pela técnica de Maldi-TOF como pertencentes aos gêneros *Ochrobactrum* (espécies *O. tritici*, *O. intermedium* e *O. anthropic*), *Brevibacillus* (espécie *B. choshinensis*), *Streptomyces* (espécie *S. griseus*), *Bacillus* (espécie *B. cereus*), *Microbacterium* (espécie *M. liquefaciens*), *Lysinibacillus sp* e *Serratia* (espécie *S. marcescens*) (Tabela 3). Outros gêneros, como *Pseudomonas*, *Flavobacterium* e *Sphingomonas* também foram identificados, mas com baixo score. Assim, a identificação foi confirmada pelo método de sequenciamento de regiões do gene do rRNA 16S.

Tabela 3: Identificação de bactérias da membrana pela técnica de Maldi-TOF Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - MALDI (Bruker, Alemanha). As cruzes indicam os parâmetros usados na técnica para a identificação das espécies: altamente provável (+++), identificação segura do gênero (++), provável identificação do gênero (+) e identificação não confiável (-).

Código	Bactérias identificadas	Número de morfotipos identificados	Origem na membrana
AA3	<i>Ochrobactrum sp</i> (++)	11	Entrada da membrana módulo 1
M3	<i>Ochrobactrum tritici</i> (+++)	2	Meio da membrana
BB51	<i>Ochrobactrum intermedium</i> (+++)	5	Saída da membrana módulo 2
BA5	<i>Ochrobactrum anthropi</i> (+++)	3	Saída da membrana módulo 1
BA56	<i>Brevibacillus choshinensis</i> (+++)	1	Saída da membrana módulo 1
BA1	<i>Streptomyces griseus</i> (+++)	1	Saída da membrana módulo 1
AB1	<i>Bacillus sp</i> (++)	3	Entrada da membrana módulo 2
M4	<i>Bacillus cereus</i> (+++)	1	Meio da membrana
AB2A	<i>Microbacterium liquefaciens</i> (+++)	1	Entrada da membrana módulo 2
BA5A	<i>Microbacterium sp</i> (++)	1	Saída da membrana módulo 1
AA51	<i>lysini bacillus sp</i> (++)	2	Entrada da membrana módulo 1
M8	<i>Serratia marcescens</i> (+++)	4	Meio da membrana

Esses gêneros são considerados mesófilos e de distribuição ubíqua, sendo encontrados no solo, em ambientes aquáticos ou associados a plantas e, ainda, em biofilmes de membranas de filtração no tratamento de águas doces e salinas.

Acinetobacter, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Arthrobacter* e *Micrococcus*, por exemplo, foram descritos em biofilmes em membranas de osmose inversa por técnicas baseadas em cultivo, incluindo o cultivo no meio R2A (Ridgway et al., 1983 e 1984). Bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, e *Ochrobactrum* têm sido descritas como eficazes na remoção de compostos orgânicos em águas residuárias contaminadas com óleo. Nesses estudos, foi observado que essa atividade é influenciada pela concentração de hidrocarbonetos do petróleo, salinidade e concentração de sólidos dissolvidos e a composição de nutrientes (Pendashteh et al., 2010; Singh et al., 2014).

Tem sido sugerido que a alta pressão e salinidade nas membranas de filtração constituem fator de seleção de certos grupos bacterianos, resultando em diferenças entre a composição das comunidades bacterianas presentes nos diversos tipos de água de alimentação e compartimentos de pré-tratamento e as presentes nas membranas. No estudo realizado por Bereschenko e colaboradores (2008), por exemplo, foi observado que os filotipos típicos de biofilmes em membranas de osmose inversa são Proteobacteria, grupo Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides e Firmicutes, que também estavam presentes na água de alimentação. No entanto, as abundâncias relativas dos diferentes grupos no biofilme maduro eram diferentes daquelas encontradas na água de alimentação, indicando que o biofilme foi formado ativamente nas membranas e não resultado de uma mera concentração de bactérias oriundas da água de alimentação. No biofilme, 59% das bactérias pertenciam à classe Proteobacteria, com predomínio de *Sphingomonas* sp. (27%).

Membros desse gênero parecem ser responsáveis pela bioincrustação das membranas de osmose inversa e nanofiltração (Ivnitsky et al., 2007; Bereschenko et al., 2008). Esse gênero tem sido encontrado como colonizador primário de membranas e ainda como membro dominante durante as diversas etapas do desenvolvimento do biofilme (Bereschenko et al., 2008 e 2010). Isso tem sido atribuído à características como crescimento em ambiente tanto oligotrófico como rico em compostos orgânicos, composição da parede celular, que a torna hidrofóbica devido à presença de glicosfingolipídeos em vez de lipopolissacarídeos, produção de exopolissacarídeos do tipo esfinge, que facilita a adesão à superfície da membrana e protege as células contra efeitos adversos de pH, temperatura, salinidade, pressão e de agentes utilizados na limpeza e desinfecção das membranas (Pollock, 1993; Xu et

al., 2015; Bereschenko et al., 2010; Nagaraj et al., 2017; Vries et al., 2020). Bactérias redutoras de nitrato e nitrito, como Rhizobiales, Burkholderiales e algumas Pseudomonadales também foram prevalentes em todas as membranas incrustadas usadas para purificação de água. Esse padrão foi associado tanto à versatilidade metabólica dos grupos quanto à produção de energia na presença e ausência de oxigênio (Al Ashhab et al., 2014).

6.1.2 Purificação dos fagos

Na etapa de confirmação da pureza e repurificação dos estoques dos fagos do LMA, foram obtidos um total de 35 morfotipos (descrição em anexo). Esses fagos foram multiplicados para uso nos ensaios de espectro de hospedeiros.

6.2 Caracterização dos bacteriófagos quanto ao espectro de hospedeiro, MOI, estabilidade a pH e temperatura, e caracterização morfológica por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

6.2.1 Espectro de Hospedeiro

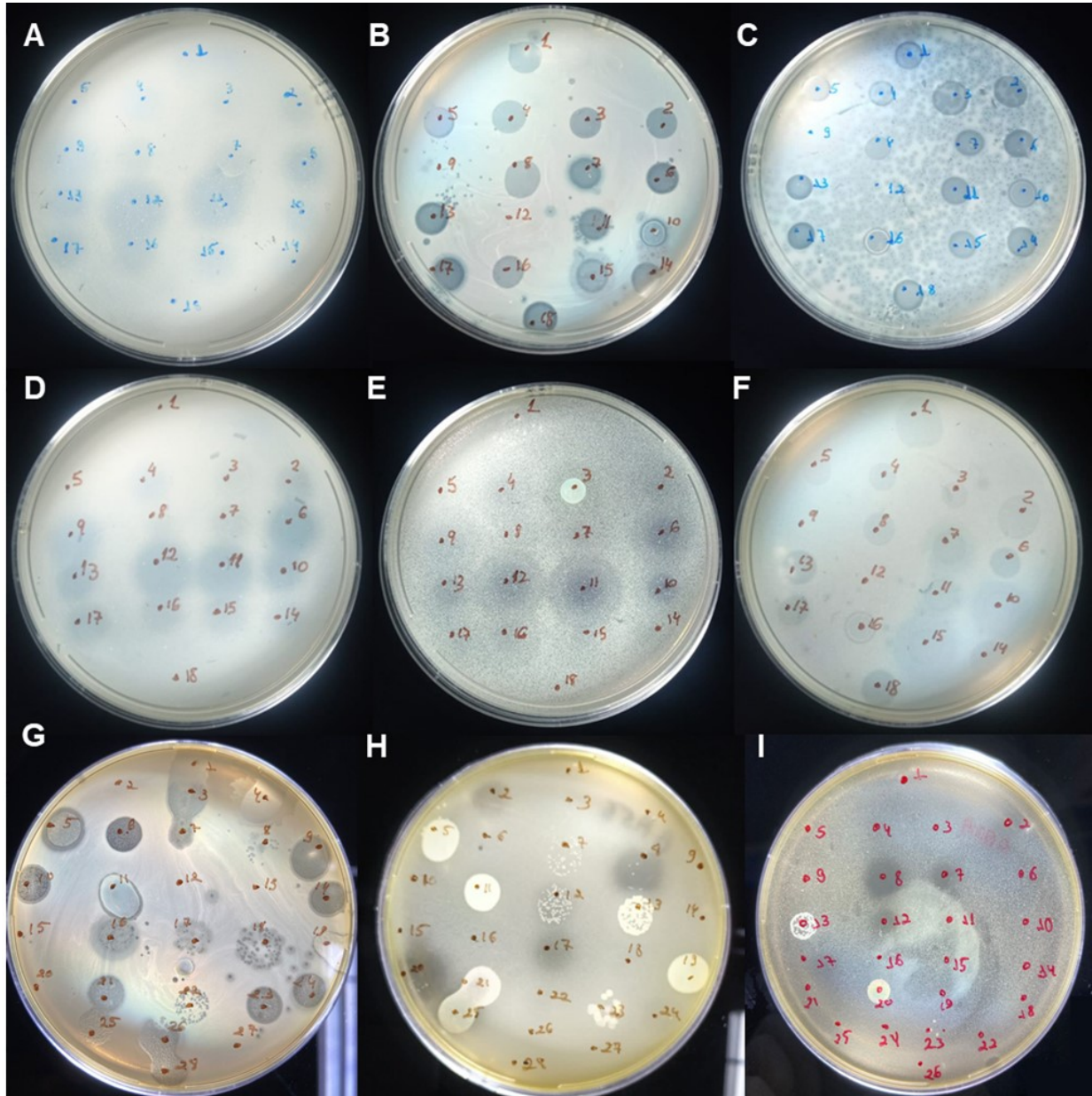
Dos 35 fagos testados, os denominados P3 (PLA5), P1 e P2 (RLI 33), 18C, P4P e 18.2.2 (RLI 17) foram os que apresentaram maior variedade de hospedeiros, sendo ativos contra a maioria dos isolados bacterianos identificados pela técnica de MALDI-TOF. Os fagos P3 (PLA5), P1 e P2 (RLI 33) apresentaram perfis iguais de espectro de hospedeiro com atividade lítica para os isolados *Ochrobactrum intermedium* (BB51), *Ochrobactrum anthropi* (BA5), *Serratia marcescens* (M8), *Bacillus sp.* (AB1), *Bacillus cereus* (M4) e *Lysinibacillus sp* (AA51), sendo este último lisado apenas por P1 e P2 (RLI 33) e *Bacillus cereus* (M4) lisado só por P3 (PLA5).

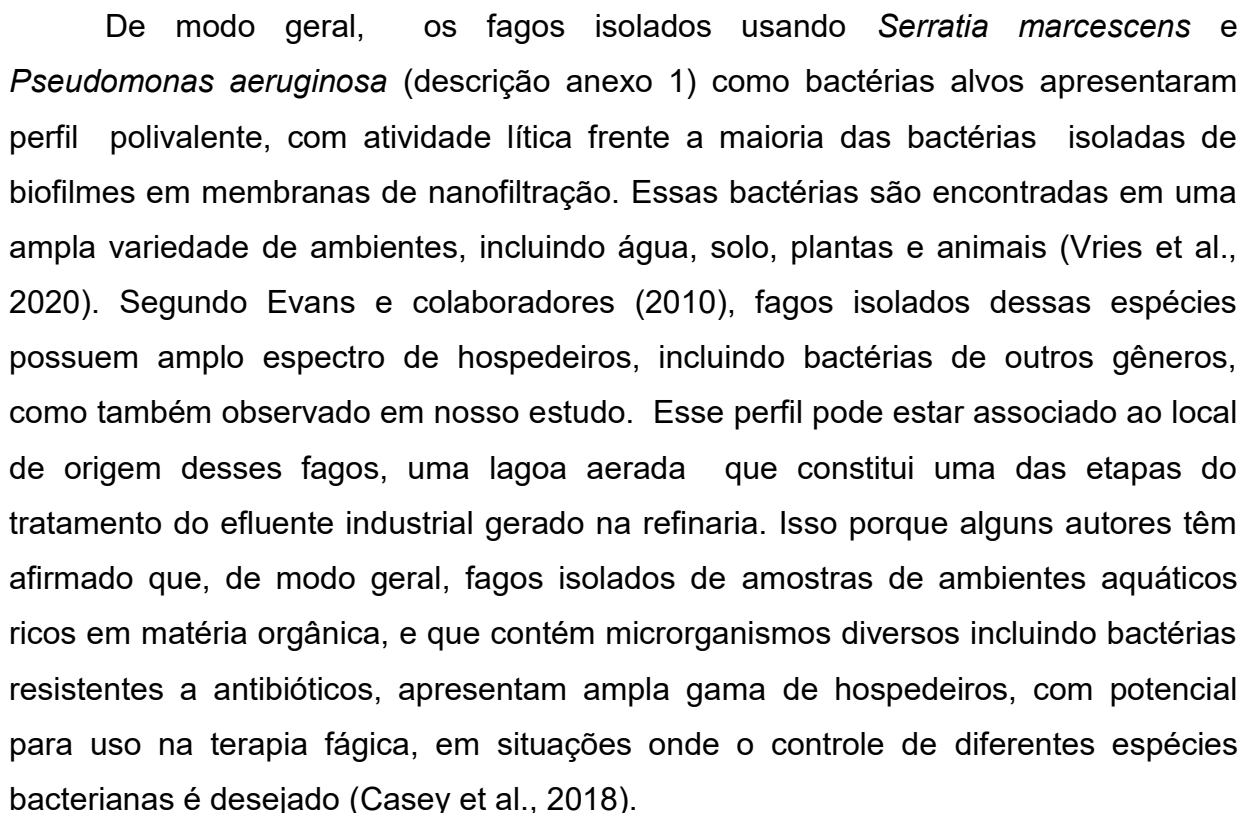
As suspensões 18C, P4P e 18.2.2 (RLI 17) também apresentaram perfis semelhantes lisando *Ochrobactrum tritici* (M3), *Bacillus cereus* (M4), *Bacillus sp* (AB1), *Brevibacillus sp* (BA56) e *Microbacterium liquefaciens* (AB2A), sendo o isolado *Bacillus sp* (AB1) lisado apenas por P4P e 18.2.2, e *Microbacterium liquefaciens* lisado por P4P e 18C. O fago 18C também foi ativo contra *Lysinibacillus sp* (AA51), assim como o fago 18.2.2 com atividade para *Serratia marcescens* (M8).

Apenas 2 dos bacteriófagos, 17.2 e 18.1.1 (RLI 17), não apresentaram lise para nenhum dos morfotipos avaliados. As demais suspensões fágicas igualmente

apresentaram atividade lítica contra os diferentes morfotipos isolados e identificados, entretanto com menor variedade de hospedeiros. Os fagos B1, B2, B3, B4 e B6 oriundos da hospedeira RLA 12 lisaram as bactérias *O. intermedium* (BB51), *O. anthropi* (BA5), *Serratia marcescens* (M8) e *Lysinibacillus sp* (AA51). Os fagos P2 e P3 (RLI 17) também apresentaram espectro de hospedeiros semelhante, sendo capazes de lisar as bactérias *Bacillus cereus* (M4), *Bacillus sp* (AB1) e *Microbacterium liquefaciens* (AB2A). P4M, 17.1.2 (RLI 17) apresentaram perfis de lise semelhantes para *Ochrobactrum tritici* (M3), *Bacillus cereus* (M4), P4M ainda lisou *Brevibacillus sp* (BA56) e 17.1.2 lisou *Bacillus sp* (AB1). Os fagos P2 e 11.1.2 (PLA5) apresentaram atividade lítica semelhante para *O. intermedium* (BB51) e *O. anthropi* (BA5). Entretanto, eles também apresentaram perfis diferentes para alguns dos morfotipos testados, sendo P2 (PLA5) com lise para *Lysinibacillus sp* (AA51), e 11.1.2 (PLA5) com lise em *Serratia marcescens* (M8). As suspensões P1, 18.1.2, 18.2.4 (RLI 17) foram restritas às espécies *Ochrobactrum tritici* (M3) e *Bacillus cereus* (M4), assim como 10, 11.1.1, 11.2.1; 11.2.2, 12.2.1, 12.2.2 e 12.2.3 (PLA5) restritos a *O. intermedium* (BB51), e *O. anthropi* (BA5), além dos fagos 17.1.1 restritos a *Bacillus cereus* (M4) e *Microbacterium liquefaciens* (AB2A), e por fim 18.1.4 restrito a *Serratia marcescens* (M8) e *Bacillus cereus* (M4). Já os bacteriófagos denominados 17.1.4, 18.1.3 (RLI 17) e P1 (PLA5) apresentaram atividade lítica exclusiva com os morfotipos *Bacillus sp* (AB1), *Serratia marcescens* (M8) e *Lysinibacillus sp* (AA51), respectivamente. A tabela completa com a descrição dos fagos encontra-se em anexo.

Figura 7: Caracterização de bacteriófagos quanto ao espectro de hospedeiro pela técnica de spot. **A:** *Ochrobactrum tritici*. **B:** *Ochrobactrum intermedium*. **C:** *Ochrobactrum anthropi*. **D:** *Serratia marcescens*. **E:** *Bacillus cereus*. **F:** *Bacillus* sp. **G:** *Lysinibacillus* sp. **H:** *Brevibacillus* sp. **I:** *Mycobacterium liquefaciens*.





Matsushita e colaboradores (2009) isolaram dois fagos (KSP20 e KSP100) de *S. marcescens* SM8 e um fago (KSP90) de *S. marcescens* SM18, isoladas de água de rios e esgoto, que foram testados quanto a capacidade de lisar 23 linhagens diferentes de *S. marcescens*. Os fagos KSP20, KSP90 e KSP100 formaram placas de lises em quatro (17%), oito (35%) e treze (56%) linhagens de *S. marcescens* examinadas, respectivamente. Ambos KSP90 e KSP100 apresentaram atividade lítica, avaliada pela técnica de spot em meio sólido em 65% das cepas de *S. marcescens* examinadas. Outros estudos também já mostram a capacidade de fagos de *Serratia*, em lisar linhagens diferentes da espécie hospedeira, sugerindo uma possível evolução e adaptação do fago a processos mutacionais da hospedeira (Prinsloo & Coetzee, 1964; Hamilton & Brown, 1972 ; Wu et al., 2007). Resultados semelhantes foram observados em nosso estudo onde, os fagos P1 (RLI 33), B1 a B6 (RLA 12), P3, 11.1.2 e 12.1 (PLA5) apresentaram ação lítica para *S. marcescens* (M8) isolado da membrana. Porém, estudos posteriores deverão ser realizados para avaliar se os isolados bacterianos hospedeiros, assim como o isolado testado, constituem linhagens diferentes de *S. marcescens*.

Para iniciar uma infecção, o fago deve primeiro reconhecer e ligar a um ou mais receptores na superfície de uma célula bacteriana suscetível. Muitos dos fagos específicos para bactérias Gram-positivas se ligam a regiões de açúcares do peptideoglicano ou ácido teicóico (Daviosn et al., 2005, Dowah and Clokie, 2018). Já os receptores usados por fagos de hospedeiros Gram-negativos, como *Ochrobactrum*, *Serratia marcescens* e *Microbacterium*, isoladas em nosso estudo, parecem limitados a proteínas específicas e/ou porções de lipopolissacarídeos (LPS) presentes na membrana externa da parede celular (Washizak et al., 2016; Kortright et al., 2020).

A maioria dos fagos de *Pseudomonas* usam LPS (Jarrell e Kropinski, 1976, 1981; Temple et al., 1986; Yokota et al., 1994; Lam et al., 2011) e uma minoria pili tipo IV (PTQ) (Heo et al., 2007; Bae e Cho, 2013). Enquanto LPS é exclusivo de bactérias Gram-negativas, PTQ é uma estrutura de superfície comum em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Ele confere muitas funções às bactérias, como motilidade, aderência, absorção de DNA, agregação bacteriana e patogênese (Craig et al., 2004; Bahar et al., 2009; Denis et al., 2019) e virulência (Bahar et al., 2009; Dumenil, 2019). No nosso estudo, *Bacillus cereus*, *Bacillus sp*, *Lysinibacillus sp*, e

Brevibacillus choshinensis foram lisados pela maioria dos fagos isolados usando *P. aeruginosa* como hospedeira. Devido a capacidade de infectar tanto bactéria Gram-positiva como Gram-negativa, espera-se que os receptores usados por eles devam estar presentes nesses dois tipos de grupos de bactérias, como é o caso de PTQ (Casey et al., 2018). O conhecimento dos tipos de receptores expressados pelos fagos e da interação fago-hospedeiro são essenciais para a formulação de coquetéis eficazes que visem o controle de biofilmes em membranas.

Com relação ao gênero *Ochrobactrum* identificado em nosso estudo, Decewicz e colaboradores (2020) afirmam que são raros os fagos líticos em espécies deste gênero. No entanto, Jackel e colaboradores (2017) por meio de análises genômicas observaram a presença de profagos neste gênero com homologia para fagos já descritos em outros gêneros, como *Pseudomonas*, várias Enterobacteriaceae e até mesmo *Bacillus*, indicando que o gênero *Ochrobactrum* também pode ser infectado por fagos desses grupos. Estes achados podem explicar os dados encontrados em nosso estudo, onde algumas espécies do gênero *Ochrobactrum* foram sensíveis aos fagos P1, P4P, P4M, 17.1.2, 18.1.2, 18.2.2, 18.2.4 e 18C isolados usando *P. aeruginosa* como hospedeira; P1 e P2 isolados da hospedeira *S. marcescens* (RLI33). B1, B2, B3, B4 e B6 isolados da hospedeira *S. marcescens* (RLA12) e P1, P2, P3, 10, 11.1.1, 11.1.2, 11.2.1, 11.2.2, 12.1, 12.2.1, 12.2.2 e 12.2.3 isolados da hospedeira *S. marcescens* (PLA5).

Entretanto, onze espécies não identificadas do gênero *Ochrobactrum sp* foram resistentes a todos os fagos testados. Uma hipótese para essa modificação de susceptibilidade pode estar relacionado a especificidade de receptores no nível de linhagens, ou até mesmo a presença de fagos lisogênicos nas suspensões. Lin e colaboradores (2017) descrevem em seus estudos como os profagos podem transportar genes de resistência bacteriana a fagos, como os que codificam proteínas de ligação ao receptor. Nordstrom e colaboradores (2022), ao caracterizarem o genoma de amostras clínicas de *P. aeruginosa* em busca de sequências de profagos, encontraram um total de seis diferentes profagos em mais de um isolado e que apresentavam agrupamentos gênicos semelhantes com outros fagos de diferentes linhagens de *P. aeruginosa*. Por esses motivos, é aconselhável que fagos capazes de conversão lisogênica sejam evitados durante a seleção de fagos para a terapia fágica pois, estes facilmente convertem seus hospedeiros para se tornar resistente a

infectividade de outros fagos (Lin et al., 2017) Além disso, é recomendado selecionar fagos com morfologias líticas para a terapia fágica e o preparo de coquetéis à base de fagos (Casey e colaboradores 2018).

Para a continuidade da nossa pesquisa, as suspensões de fagos 18C, isolado da linhagem *Pseudomonas aeruginosa* (RLI 17) e o P1, isolado da linhagem *Serratia marcescens* (RLI 33), se sobressaíram por exibirem uma ampla faixa de hospedeiros, com atividade lítica em cinco bactérias de diferentes espécies que abrangeram tanto Gram-negativas como Gram-positivas. Outros fagos como P3 (PLA5), P2 (RLI 33), P4P e 18.2.2 (RLI 17) também apresentaram o mesmo número de bactérias alvo. Contudo, os fagos 18C e P1 em conjunto, abrangeram atividade lítica com isolados distintos de forma que englobasse a maioria das bactérias testados, além de apresentar características bem delimitadas de fagos líticos sendo assim, a continuidade do estudo se sucedeu com esses fagos.

6.2.2 Avaliação da atividade bacteriolítica com diferentes MOIs

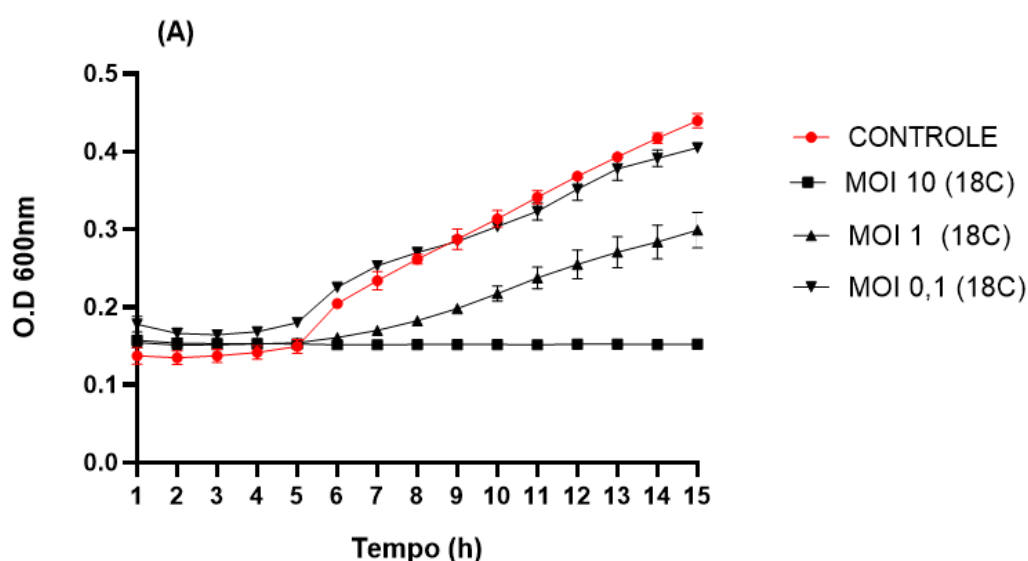
Nos ensaios para definir a MOI associada a maior atividade lítica, os fagos do nosso estudo promoveram redução diferenciada do crescimento das bactérias hospedeiras com a mudança da relação fago e bactéria utilizada.

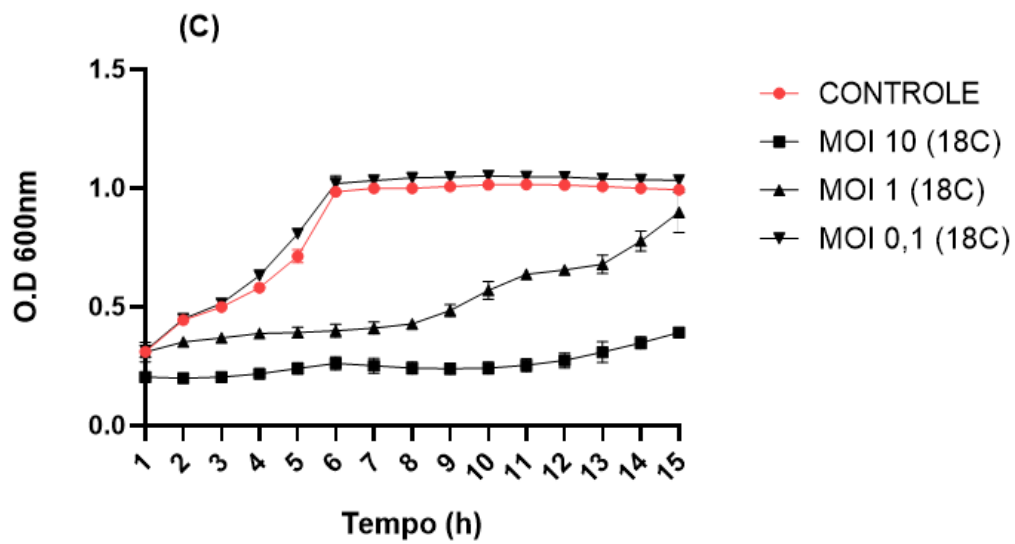
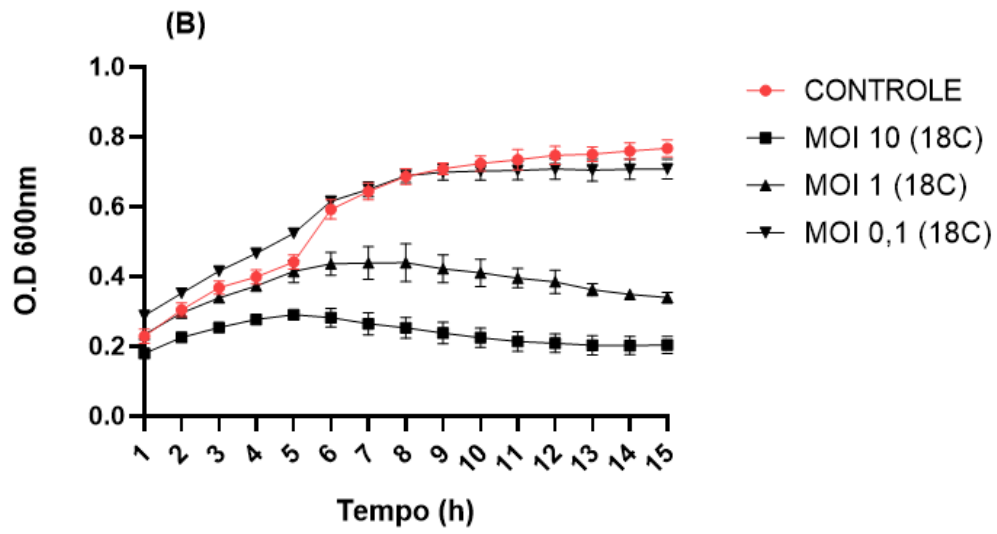
Para o fago 18C, a redução no crescimento dos isolados *Microbacterium liquefaciens* (AB2A) (Figura 9-A), *Lysinibacillus* sp (AA51) (Figura 9-B), *Bacillus cereus* (M4) (Figura 9-C), e *Brevibacillus choshinensis* (BA56) (Figura 9-D) foram mais acentuada nas infecções com MOI de 10, com os seguintes percentuais de redução AB2A (53%), AA51 (63%), M4 (69%) e BA56 (56%). De modo geral, nessa MOI, a redução foi superior a 50% para a maioria dos morfotipos e se manteve durante todo o tempo avaliado, em M4 até 10h. Alvi e colaboradores (2020) também demonstraram a capacidade de um fago da antiga família *Podoviridae* (RLP) isolado de *P. aeruginosa* de controlar o crescimento de amostras clínicas de *P. aeruginosa* por até 20h, quando aplicado em um MOI de 10. Scarascia e colaboradores (2018), estudando fagos de *Pseudomonas* em condições salinas, demonstram que os bacteriófagos exibiram infectividade ótima em uma multiplicidade de infecção de 10 para diferentes bactérias pertencentes aos grupos *Alphaproteobacteria*, *Pseudoalteromonas* e *Planococcaceae* e que são encontradas em ambientes marítimos. Além disso, os autores verificaram diferenças na duração da fase latente

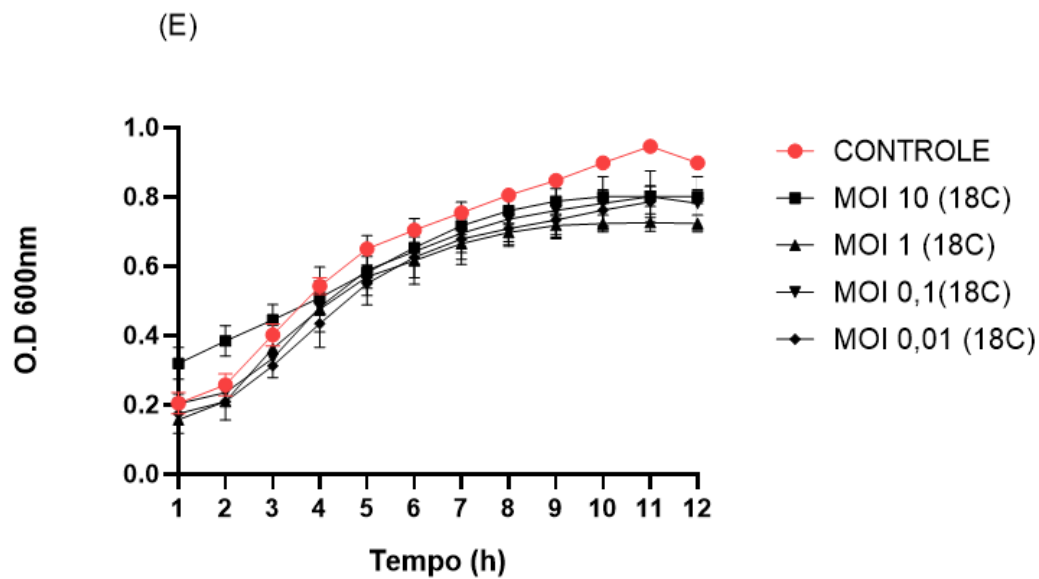
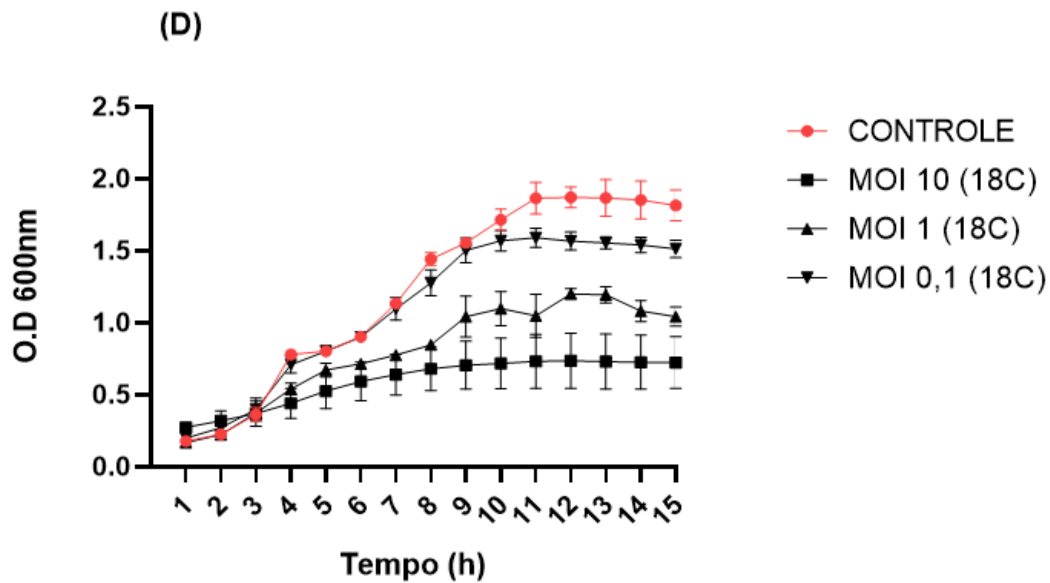
entre as culturas tratadas com bacteriófagos. Nos isolados AB2A e M4, a extensão do que aparenta ser de fase latente teve duração de aproximadamente 5h, no entanto, com a MOI de 10, o isolado AB2A se manteve estável nesta provável fase durante todo o ensaio. Já M4 se manteve nessa fase por cerca de 12h de ensaio.

Em geral, a maioria dos fagos da antiga família *Podoviridae* tem uma fase de eclipse, onde não há aumento do número de partículas infecciosas na célula hospedeira. Esse período ocorre para que o fago possa produzir vírions suficientes dentro de um período de tempo (cerca 10 e 110 min) para infectar as bactérias hospedeiras (Fan et al., 2017). Em nosso estudo, não realizamos ensaios de ciclo de crescimento único para definir esses parâmetros. Contudo, tendo como base os ensaios de MOI, supomos que para os isolados AA51 e BA56 do nosso estudo, esse período durou cerca de 6h e 8h, respectivamente, não condizente com as proposições do autor. Talvez a MOI utilizada pode ter interferido nesse processo. Em M3, a redução observada foi baixa, correspondendo a 13% com a MOI de 0,1. Valores de MOIs menores resultaram em diminuição nos percentuais de inibição do crescimento ao longo do tempo.

Figura 9: Atividade lítica do fago 18C em diferentes MOIs frente a diferentes espécies bacterianas. **A:** *Microbacterium liquefaciens* (AB2A). **B:** *Lysinibacillus* sp (AA51). **C:** *Bacillus cereus* (M4). **D:** *Brevibacillus choshinensis* (BA56). **E:** *Ochrobactrum tritici* (M3).





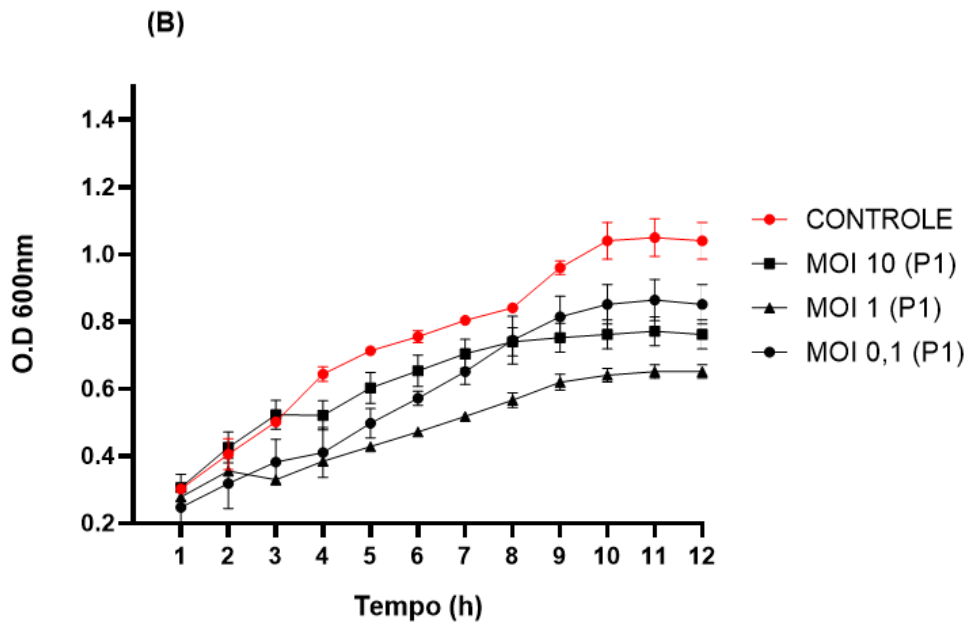
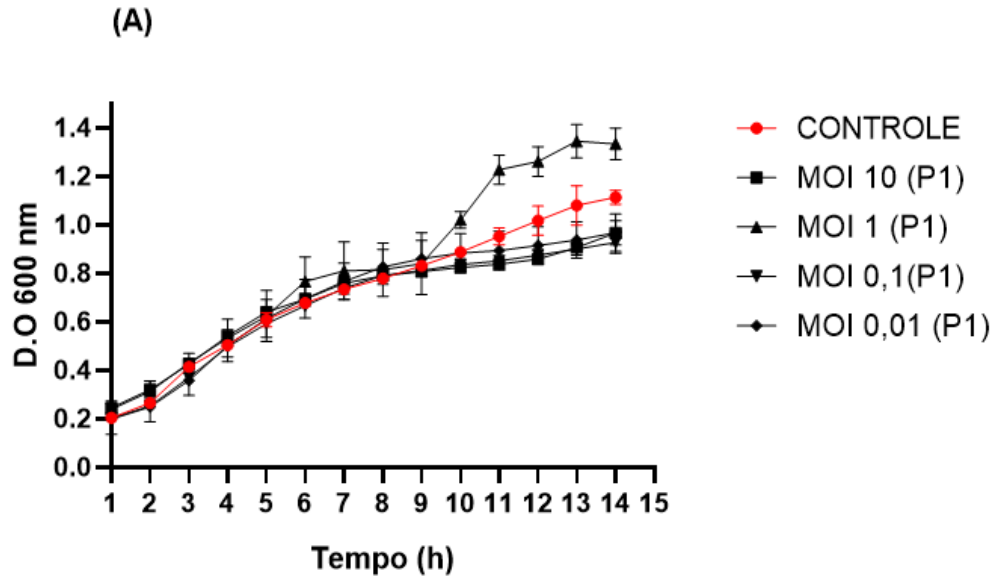


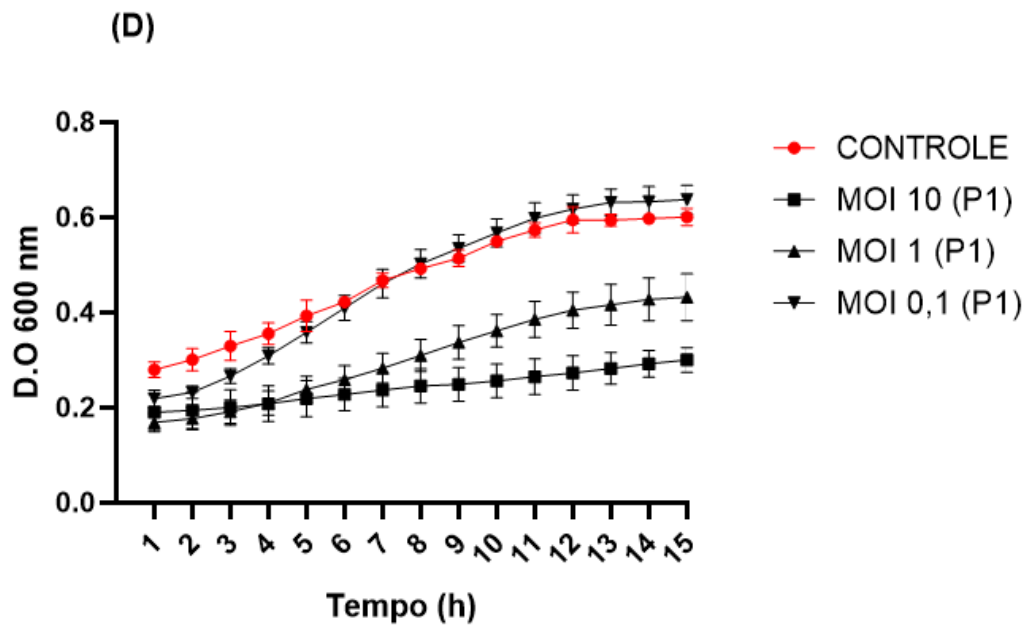
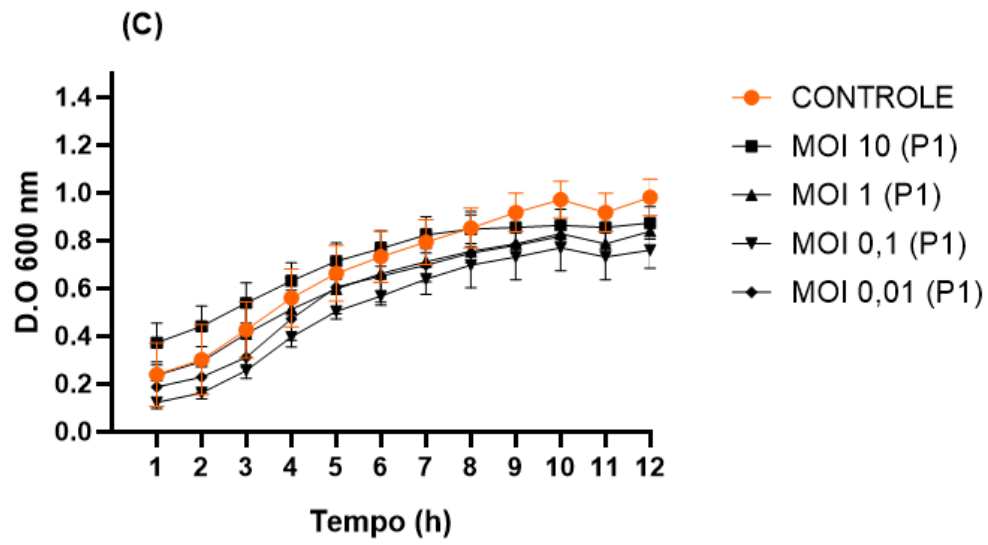
Já com relação ao fago P1 (RLI 33), houve um padrão de maior redução de crescimento em MOIs menores para a maioria dos isolados testados. Em *Serratia marcescens* (M8) (Figura 10-E), o fago foi capaz de cessar o crescimento em todas as MOIs testadas. Efeito semelhante foi observado por Matilla e colaboradores (2014), ao avaliarem a capacidade do bacteriófago ϕ MAM1 pertencente família *Myoviridae* (classificação taxonômica antiga) de lisar *Serratia* em diferentes MOIs. Weber e colaboradores (2020), ao testarem o fago SALSA (vB_SmaP-SALSA) isolado de *S. marcescens* clínica contra a cepa SM01 de *S. marcescens* observaram resultados

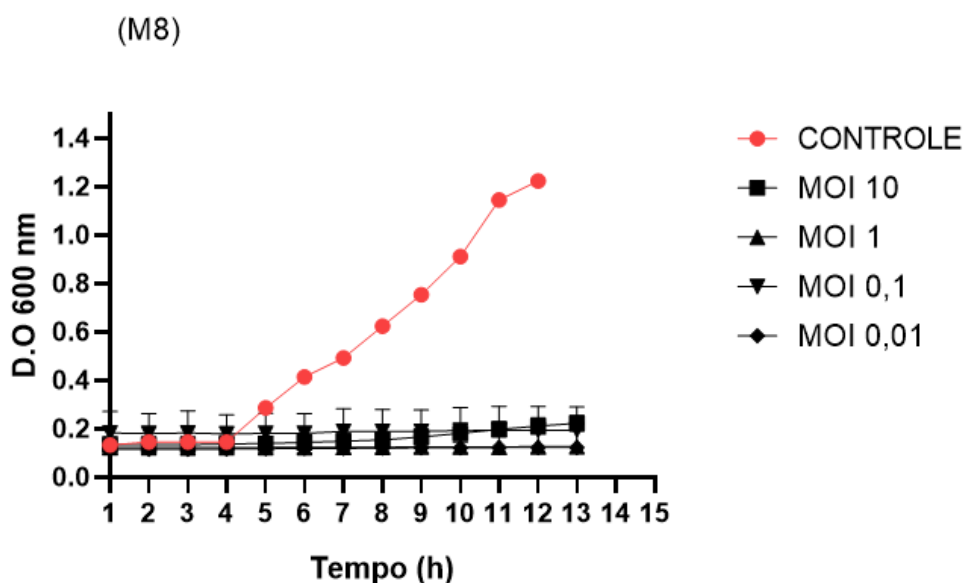
semelhantes ao nosso, com um rápido declínio no crescimento bacteriano nas primeiras 12h no teste com MOI 0,01.

Ochrobactrum anthropi (BA5) (Figura 10-B) e *O. intermedium* (BB51) (Figura 10-C) tiveram seus crescimentos reduzidos com a MOI 1 (46%) e MOI 0,01 (23%), respectivamente. No entanto, o crescimento bacteriano ocorreu de forma constante até o final do ensaio para ambos os isolados. Weber e colaboradores (2020) argumentam que este fato pode estar relacionado às condições favoráveis de testes *in vitro*, onde meios de cultura ricos e nutritivos podem permitir que as bactérias apresentem mecanismos de resistência ao fago. Outra hipótese pode estar relacionada à especificidade de receptores, como já mencionado anteriormente. Davis e colaboradores (2016) observaram que para superar o ataque do fago, as populações bacterianas podem ser caracterizadas pela heterogeneidade genética, onde a variação alélica já está presente em poucas células que ganham uma vantagem seletiva após a predação do fago. Este fato pode explicar também o ocorrido em *Lysinibacillus* sp (AA51) (Figura 10-A) que não teve seu crescimento reduzido quando comparado ao controle sem presença do fago. Para *Bacillus* sp. (AB1) (Figura 10-D), a MOI de 10 foi a que resultou em maior diminuição do crescimento bacteriano com 50% de redução. No entanto, foi observado um aumento do crescimento após 10h de ensaio, seguido de uma estabilização nas últimas horas de experimento. Esses resultados estariam de acordo com o modo de ação esperado dos bacteriófagos, em alta concentração, os fagos causam inicialmente um alto número de lises bacterianas e durante o tratamento, as bactérias resistentes aos fagos crescem rapidamente (Hernandez 2017).

Figura 10: Atividade lítica do fago P1 em diferentes MOIs frente às bactérias: **A:** *Lysinibacillus* sp (AA51), **B:** *Ochrobactrum anthropi* (BA5), **C:** *Ochrobactrum intermedium* (BB51), **D:** *Bacillus* sp (AB1) e **E:** *Serratia marcescens* (M8).







6.2.3 Avaliação da estabilidade dos fagos a diferentes variações de pH e temperatura

Para as análises de estabilidade, foram comparadas o efeito dos tempos de exposição (1h, 2h e 3h) no título de fagos dentro de cada nível da variável em análise. O teste de estabilidade ao pH no que se refere ao fago 18C (Figura 11-e), mostrou efeito negativo e significativo do pH ($p < 0,05$) somente após exposição por 2h, com reduções do título em 21% no pH de 3,0, 21% no pH 4,0, 18% no pH 6,0 e 6% pH 7,0. Para o pH 3,0, os valores de redução aumentaram com o aumento do tempo de exposição ($p < 0,05$). Quanto ao fago P1 (Figura 12-e), durante a exposição por 2h, há efeito significativo e redução do título nos valores de pH 8,0 (12%) e 9,0 (13%) ($p < 0,05$). Com o aumento do tempo de exposição para 3h, houve também diminuição significativa no pH 9,0 ($p < 0,05$).

De modo geral, ambos os fagos se mantiveram viáveis para os valores de pH que variaram do ácido ao básico, durante o tempo de exposição, com poucas variações significativas nos títulos. A alta estabilidade de fagos de *P. aeruginosa* a variações de pH já foi observada em outros trabalhos. Adnan e colaboradores (2020) avaliaram os efeitos do pH na estabilidade do fago MA-1 isolado de *P. aeruginosa* a partir de águas residuais e observaram boa estabilidade do fago na faixa de 3,0 a 11,0. Alic e colaboradores (2017), ao investigarem a estabilidade do bacteriófago

BF25/12 pertencente à antiga família *Podoviridae*, também destacaram resultados onde o fago teve uma maior sensibilidade a pHs mais ácidos, porém estável em pHs neutros e alcalinos. Já o fago RLP, isolado de *P. aeruginosa* e pertencente à família *Podoviridae*, foi estável em vários valores de pH (pH 5-9), não sendo observadas variações de título em pH neutro (Alvi et al., 2020). Esse padrão de variações destacado nos trabalhos foi semelhante em parte ao nosso estudo. Apesar da boa estabilidade nas faixas de pHs testados, houve algumas variações significativas de título ao longo do tempo de ensaio sendo a maior observada em pH neutro.

Em relação ao fago P1, houve diminuições significativas do título entre os pHs alcalinos avaliados, 8,0 e 9,0. O que condiz com o perfil observado para outros fagos isolados de *Serratia*. Vieira e colaboradores (2021), ao avaliarem a estabilidade do bacteriófago UFV01 pertencente à família *Podoviridae* gênero *Teseptimavirus* (grupo de vírus líticos) em diferentes pHs (2, 4, 7,2, 10 e 12), verificaram que o fago foi estável em pH 7, com diminuições drásticas do título nos pHs básicos. Bujak e colaboradores (2020), realizando estudos com o fago BZS1 isolados de *Serratia*, e nas mesmas condições, observaram quase 100% de estabilidade sob valores de pH variando de 7,0 a 9,0, enquanto os títulos do fago diminuíram com o aumento da acidez ou basicidade acima de 9,0.

A temperatura também é um fator determinante nas propriedades infecciosas dos fagos (Jonczyk et al., 2011). Ela influencia na viabilidade e no armazenamento, além de afetar vários estágios da infecção do fago, desde a fixação até o período latente, sendo, portanto, um fator crucial para a sobrevivência dos bacteriófagos (Vieira et al., 2021). Em nosso trabalho, os bacteriófagos avaliados foram capazes de causar infecção dentro de uma ampla faixa de temperatura, de 30°C a 60°C. Para o fago 18C (Figura 10-C), a 30°C houve efeito negativo e significativo ($p < 0,05$) após exposição por 3h. Assim como as temperaturas de 50° C e 60° C, com reduções significativas ($p < 0,05$) no intervalo de 3h. Com relação ao fago P1, diminuições significativas ($p < 0,05$) foram observadas a 50°C durante as exposições de 2 e 3h. E na exposição a 60°C, houve perdas imediatas de atividades que aumentaram com o tempo de exposição.

Assim como a estabilidade ao pH, foi observado, que o fago 18C apresentou uma sensibilidade maior frente a variações de temperatura, se comparado ao fago P1.

Uma hipótese para essa variação pode estar relacionada à estrutura do fago, bem como os receptores usados na etapa de adsorção do ciclo de multiplicação. Parâmetros como pH e temperatura podem induzir alterações conformacionais em receptores, aumentando ou restringindo o acesso da proteína lítica no sítio de domínio da parede celular bacteriana (Schmelcher et al., 2016). Alterações conformacionais também podem ocorrer em endolisinas, entretanto, de maneira positiva, para que o fago consiga contornar o estresse gerado pelas variações de estabilidade. Essas proteínas possuem mecanismos como o desdobramento da sua estrutura com aumento da temperatura, diminuindo a atividade lítica, e reenrolamento instantâneo com restauração da atividade enzimática após diminuição e estabilização da temperatura (Jończyk-Matysiak et al., 2019).

É importante compreender como as condições ambientais podem afetar a infectividade dos bacteriófagos. É crucial para uma aplicação eficaz de fagos em sistemas de membranas onde as condições variam entre pH alto ou seja, o pH usual da água do mar, a pH baixo ou seja, quando a limpeza com produtos químicos é realizada, e de baixa (ou seja, na água do mar bruta) a altas temperaturas (ou seja, água do mar retida dentro da unidade de dessalinização). (Scarascia, 2018). Ambos os fagos em estudo 18C e P1, apesar das poucas variações significativas nas estabilidades avaliadas de pH e temperatura, se mostram bons candidatos no que diz respeito à terapia fágica em membranas.

Figura 11: Análise da estabilidade ao pH e temperatura utilizando teste estatístico Two-way ANOVA para análise de comparação das variáveis. a) estabilidade de pH do fago 18C exposição por 1h; b) estabilidade de pH 18C exposição por 2h; c) estabilidade 18C exposição por 3h; d) estabilidade a temperatura do fago18 C 1h, e) estabilidade a temperatura do fago18 C 2h e f) estabilidade a temperatura do fago18 C 3h.

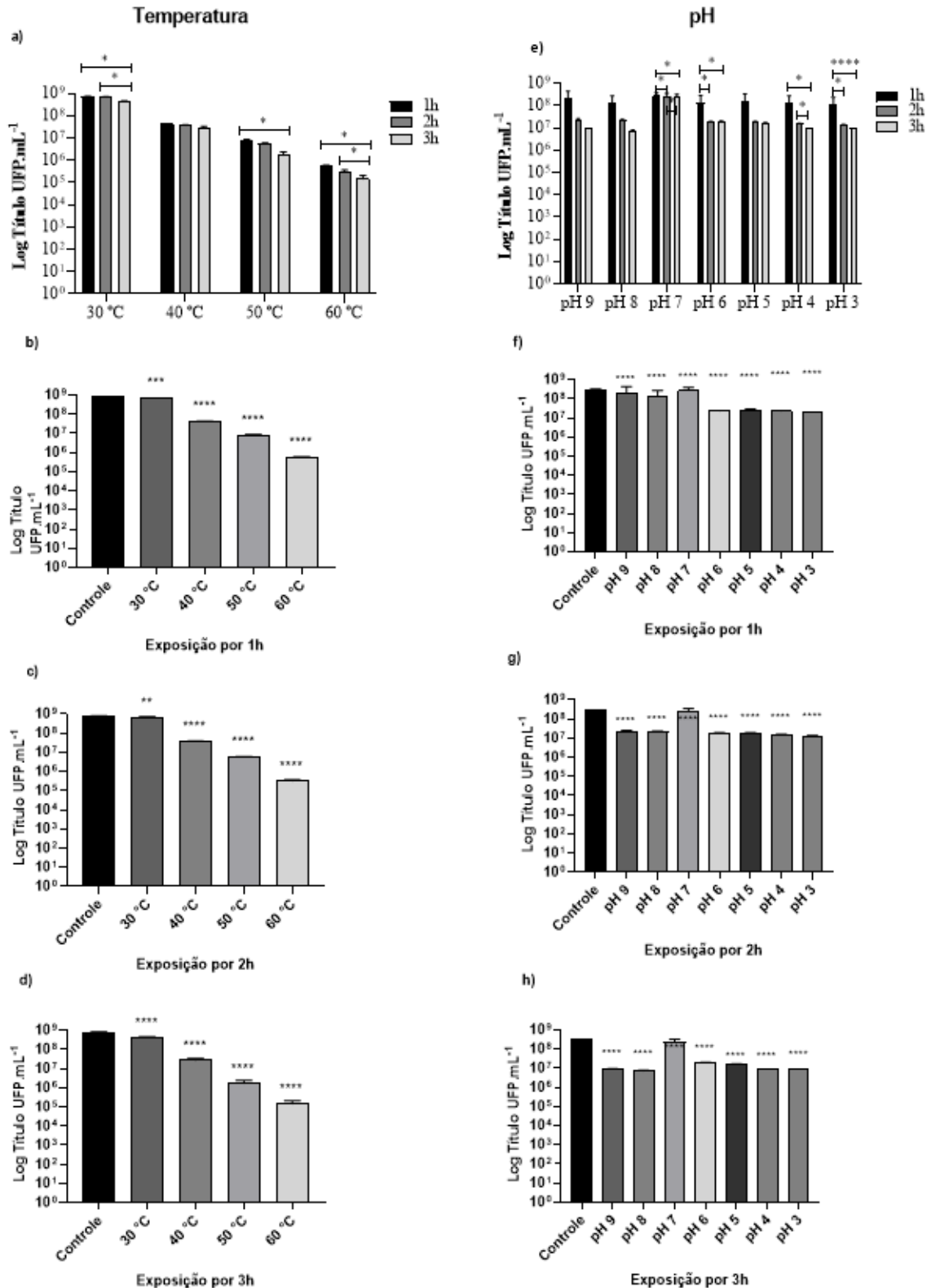
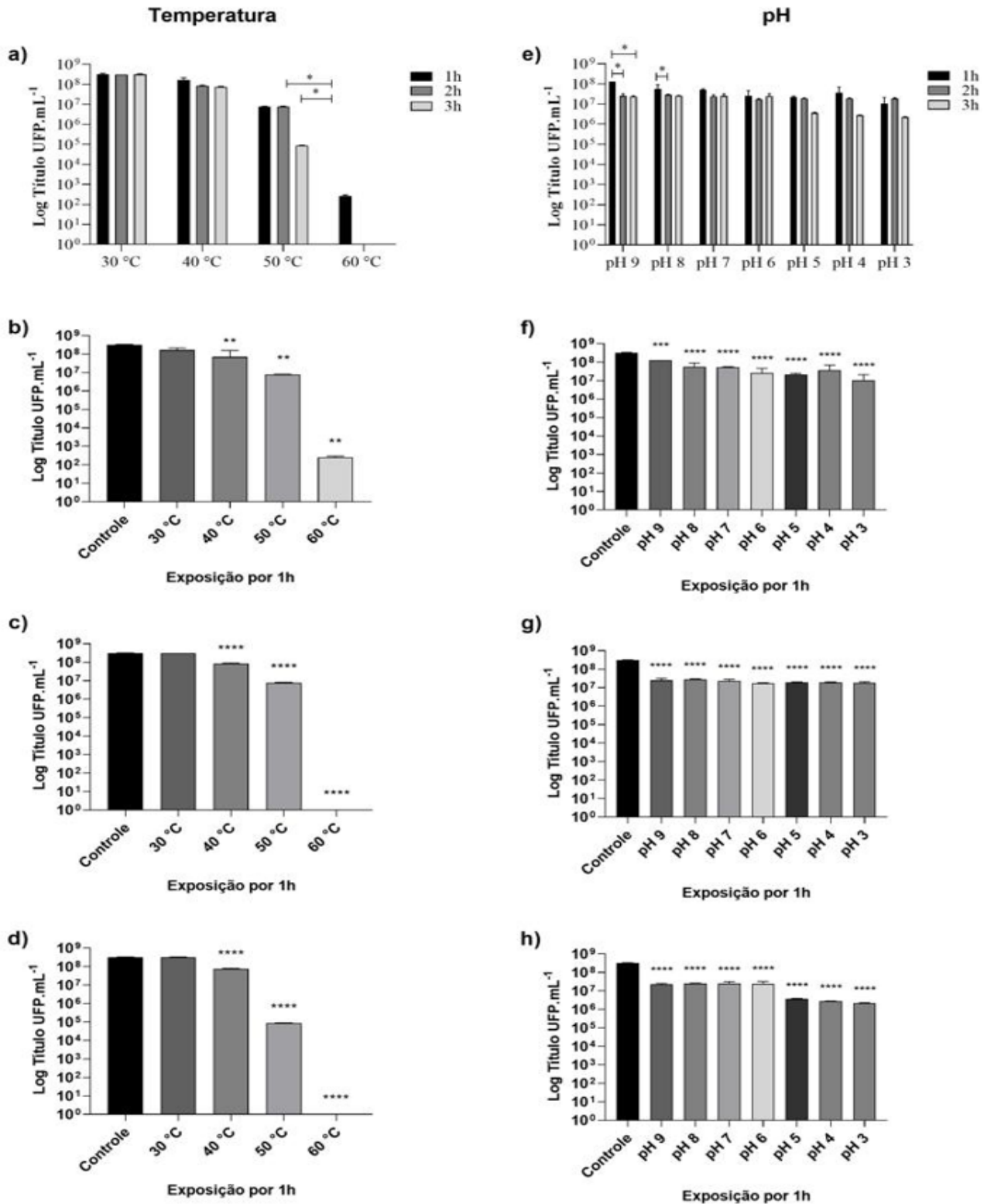


Figura 12: Análise da estabilidade a pH e temperatura utilizado teste estatístico Two-way ANOVA para análise de comparação das variáveis. a) estabilidade de pH do fago P1 exposição por 1h; b) estabilidade de pH P1 exposição por 2h; c) estabilidade P1 exposição por 3h; d) estabilidade a temperatura do fagoP1 1h, e) estabilidade a temperatura do fagoP1 2h e f) estabilidade a temperatura do fagoP1 3h.



6.2.4 Caracterização morfológica por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

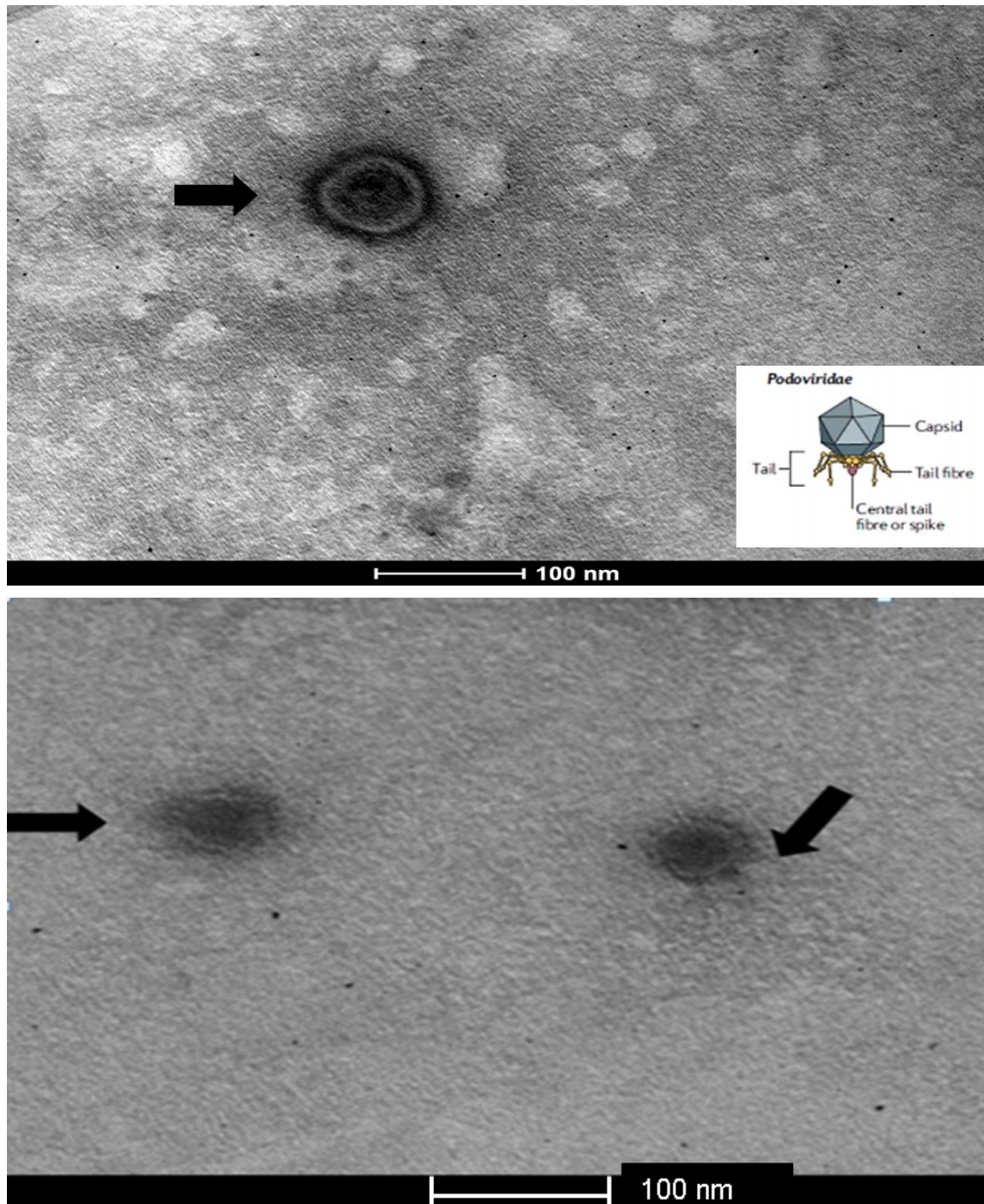
A análise de TEM da suspensão do bacteriófago identificado como 18C, proveniente da multiplicação da bactéria hospedeira *Pseudomonas aeruginosa* RLI 17. A suspensão apresentou um único morfotipo de vírus (Figuras 15-1 e 15-2). O fago possui um capsídeo icosaédrico com 49 nm de comprimento e 54 nm de largura, cauda curta com 23 nm de comprimento e 14 nm de largura, aparentemente não-contrátil, mais curta do que o diâmetro da cabeça. Essas características são sugestivas de fagos da antiga família *Podoviridae*, na antiga ordem *Caudovirales*. Os podovírus agora foram distribuídos em várias famílias distintas. A identificação e classificação precisa do fago em estudo será confirmada a partir de resultados do sequenciamento completo do genoma.

A maioria dos bacteriófagos descritos que infectam *P. aeruginosa* são membros da classe *Caudoviricetes*, ou seja, possuem morfologia de cabeça e cauda e contêm DNA de fita dupla. Essa classe apresenta 96% de todos os fagos conhecidos atualmente. A antiga família *Podoviridae* correspondia ao menor grupo entre as principais famílias também dissolvidas da antiga ordem (*Myoviridae* e *Siphoviridae*) (Robles et al, 2012; Zinke et al, 2022). Há diversos relatos na literatura de bacteriófagos líticos da família *Podoviridae* isolados de *P. aeruginosa* e que possuem uma ampla gama de hospedeiros, inclusive compondo coquetéis fágicos, com fagos dentro da própria família e até mesmo com outras famílias da antiga ordem *Caudovirales* (Reyneke 2019; Alvi et al, 2020; Kornienko et al 2020). O que é sugestivo para aplicações futuras com os outros fagos que compõem o estoque do LMA.

Na imagem 13-1 é possível também verificar algumas bolhas semelhantes a vesículas de membrana externa. As vesículas são naturalmente secretadas por bactérias Gram-negativas como *Pseudomonas* (Ellis et al., 2010). Elas desempenham um papel importante na fisiologia bacteriana, patogênese, interações intraespécies ou interespecíes, elas também agem como intensificadores da adesão microbiana e formação de biofilme, indutoras de inflamação e apoptose e como inibidores da resposta imune do hospedeiro. Ainda não há relatos deliberando o papel das vesículas de *P. aeruginosa* no combate a fagos, mas acredita-se que seja uma

estratégia de defesa desses microrganismos mediada através da resposta ao estresse bacteriano (Ellis et al., 2010; Augustyniak et al., 2022).

Figura 13: a e b respectivamente: Fago encontrado na suspensão 18C durante a análise de TEM, a seta corresponde a localização da cauda não-contrátil

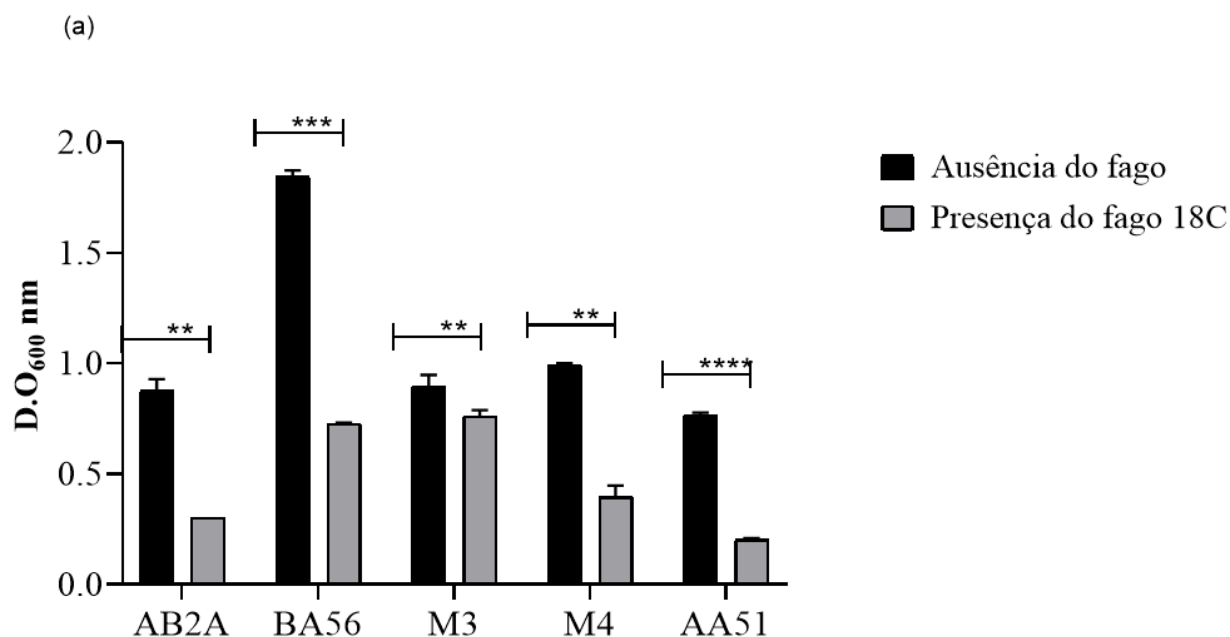


6.3 Avaliação do potencial bacteriolítico contra células planctônicas

A fim de se conhecer o potencial bacteriolítico dos fagos testados, bem como sua ação no controle da formação de biofilmes em membranas de nanofiltração, as suspensões dos fagos 18C (RLI 17) e P1 (RLI 33) foram colocadas em contato com seus hospedeiros, com os respectivos valores da MOI estabelecidos e mencionados no item 6.2.2. O bacteriófago 18C foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,05$) a $D.O_{600nm}$ em todas as amostras bacterianas potencialmente formadores de biofilmes testados, quando comparado com o crescimento na ausência do bacteriófago (Figura 14-a). Os percentuais de redução variaram com a bactéria em teste, sendo o maior valor observado para AA51 (73,3%), seguido por AB2A (65,4%), BA56 (60,6%), M4 (60,1%) e M3 (15,3%).

Fagos isolados de *Pseudomonas*, como o 18C observado em nosso estudo, possuem uma ampla distribuição ecológica e diversidade genética (Smet et al., 2017), o que pode explicar a sua ação lítica nos diferentes morfotipos testados em nosso trabalho. Guo e colaboradores (2019) em seus estudos avaliaram a atividade de dois fagos líticos isolados de *P. aeruginosa* S1 e S2, para prevenir a formação de biofilmes de *P. aeruginosa* cepa PAO1. Os resultados mostraram que os fagos sozinhos ou em combinação inibiram eficazmente o crescimento do biofilme após incubação durante 4, 8 e 24 h. Goldman e colaboradores (2009) em um estudo semelhante usando fagos líticos específicos para controle de *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter johnsonii* e *Bacillus subtilis* (separadamente e combinadas) em membranas de ultrafiltração (UF) alimentadas com efluentes sintético estéril. A atividade lítica reduziu a formação de bioincrustação da membrana em uma média de 40% a > 60% em comparação com o controle. Os resultados sugeriram o uso potencial de fagos líticos específicos para prevenir a bioincrustação da membrana de UF. Em nosso estudo, não realizamos o uso de fagos combinados ou coquetéis para avaliar a atividade lítica frente aos morfotipos testados. Entretanto, seria uma sugestão interessante para estudos futuros, principalmente buscando combinações mais efetivas para controle de biofilmes monobacterianos de mais difícil controle ou até mesmo de biofilmes polimicrobianos.

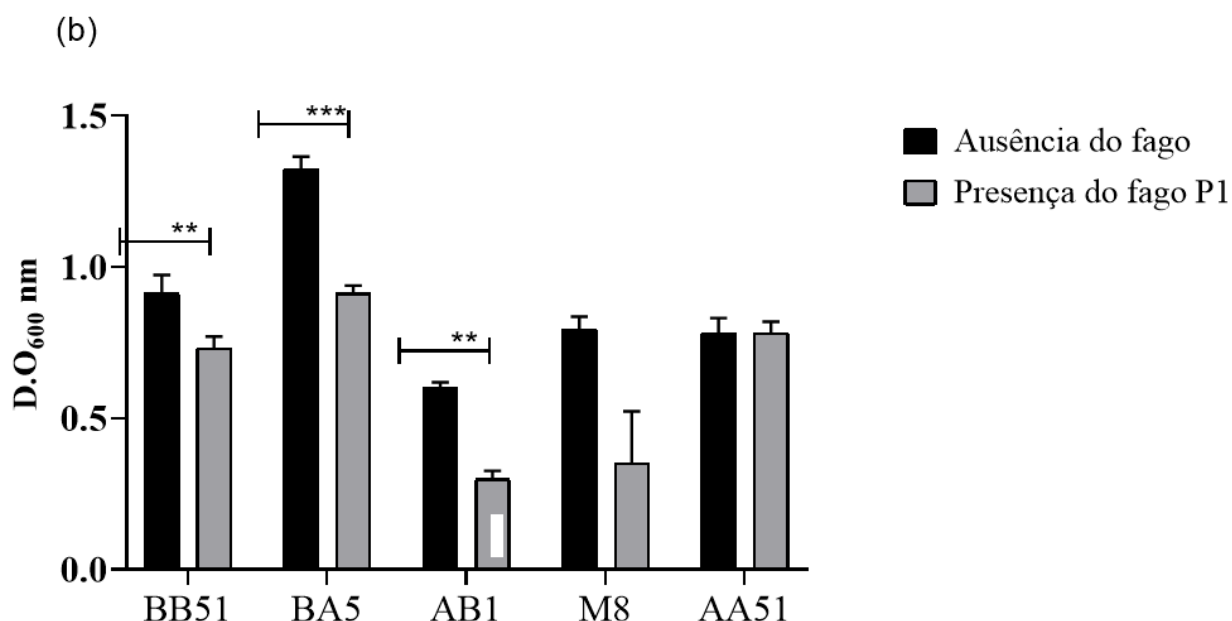
Figura 14-a: Análise da diminuição do crescimento dos isolados bacterianos potencialmente formadores de biofilmes tratados com bacteriófagos por 24h. a) Isolados bacterianos tratados com o bacteriófago 18C. Os resultados de cada tratamento compreende três replicatas e os asteriscos indicam diferença significativa pelo teste *t* quando comparados os valores de D.O_{600nm} de cada bactéria tratada com o bacteriófago e sem o bacteriófago (**, *** e **** indicam significância a 0,01% de probabilidade; 0,001% de probabilidade e 0,0001%, respectivamente). As barras indicam o desvio padrão.



Para o bacteriófago P1, a redução foi significativa ($p < 0,05$) para 4 das 5 bactérias testadas (Figura 14-b), sendo 56% para M8, 50,1% para AB1, 30,9% para BA5, e 19,8% no teste com BB51. Muito poucos trabalhos foram publicados sobre a aplicabilidade de fagos de *Serratia* para biocontrole de biofilmes industriais. Em nosso estudo, P1 se mostrou promissor no controle de alguns dos isolados da membrana. Por outro lado, apesar das reduções significativas observadas, é notável uma resistência das bactérias na infecção embora, com uma taxa de crescimento mais baixa em comparação com o controle cultivado na ausência do fago. Zhang e colaboradores (2014) relataram o mesmo padrão para um fago *Podoviridae* infectando *S. marcescens* onde, os bacteriófagos tiveram efeito na biomassa bacteriana. No entanto, a densidade bacteriana ficou próximo de atingir o nível de controle sem fago, como visto em nosso trabalho durante o período do experimento. Talvez uma eficácia maior com o uso de P1, para prevenir o desenvolvimento de uma resistência, dependa de estudos futuros que envolvam o uso de coquetéis, ou uma associação com outros agentes microbianos.

De modo geral, em nosso estudo, os bacteriófagos não só foram capazes de reduzir o crescimento de células planctônicas mas, também, evitaram a formação de biofilmes dentro do período testado. Além disso, os fagos foram estáveis em água do mar sintética (concentrações descritas no item 5.5.1) ao avaliar o potencial bacteriolítico dos mesmos. Tais resultados favorecem a aplicação dos fagos em sistemas industriais que utilizam águas marítimas como o estudo em si, além de sugerir que o efeito sobre outras bactérias dentro de uma matriz do biofilme também seriam eficiente.

Figura 14-b: Análise da diminuição do crescimento dos isolados bacterianos potencialmente formadores de biofilmes tratados com bacteriófagos por 24h. b) isolados bacterianos tratados com o bacteriófago P1. Os resultados de cada tratamento compreende três replicatas e os asteriscos indicam diferença significativa pelo teste *t* quando comparados os valores de D.O_{600nm} de cada bactéria tratada com o bacteriófago e sem o bacteriófago (**; *** e **** indicam significância a 0,01% de probabilidade; 0,001% de probabilidade e 0,0001%, respectivamente). As barras indicam o desvio padrão.



7. Conclusões e Perspectivas do Estudo

O uso de bacteriófagos em sistemas de membranas de nanofiltração fornece uma alternativa promissora e aplicável ao ambiente industrial. Os fagos podem evitar e diminuir o desenvolvimento de incrustações e corrosões decorrentes principalmente do crescimento microbiano e formação de biofilmes.

No presente estudo, os fagos oriundos da coleção do LMA apresentaram eficácia lítica frente à maioria das linhagens bacterianas isoladas dos biofilmes das membranas. P3 (PLA5), P1 e P2 (RLI 33), 18C, P4P e 18.2.2 (RLI 17) foram os que apresentaram maior variedade de hospedeiros, sendo ativos contra a maioria dos isolados bacterianos. Os fagos 18C e P1 se destacaram e foram caracterizados quanto à multiplicidade de infecção e estabilidade a variações de temperatura e pH. Características importantes quando se deseja desenvolver formulações para aplicação industrial da fagoterapia. Em relação à multiplicidade de infecção, 18C teve maior atividade lítica na MOI de 10 para a maioria dos isolados expostos à infecção, com reduções superiores a 50%. O fago P1, causou infecção com a MOI de 0,01 em parte dos isolados, entretanto MOIs maiores também se destacaram para este fago.

De modo geral, 18C e P1 se mantiveram viáveis para os valores de pH que variaram do ácido ao básico, durante o tempo de exposição, com poucas variações significativas nos títulos. 18C correspondeu a uma redução máxima de 23% do título em pHs que variaram do neutro ao ácido, enquanto P1 reduziu 13% em pHs básicos. Com relação a sensibilidade térmica, ambos os fagos resistiram até a temperatura máxima 60°C, sendo P1 estável a ação térmica mais elevada, por apenas 1h de exposição. Compreender como as condições ambientais podem afetar a infectividade dos bacteriófagos é determinante para uma aplicação eficaz da terapia fágica. 18C e P1 se mostram bons candidatos no que diz respeito à terapia fágica em sistemas de membranas.

Com relação a caracterização por TEM o fago 18C aparentemente apresentou aspectos morfológicos característicos da antiga família *Podoviridae*, contudo, análises adicionais deverão ser realizadas para distinguir e caracterizar genômicamente todos os bacteriófagos isolados. Até o momento, P1 ainda não teve sua caracterização por TEM realizada.

Os fagos foram estáveis também em água do mar sintética (concentrações descritas no item 5.5.1) ao avaliar o potencial bacteriolítico dos mesmos contra células planctônicas e prevenção da formação de biofilmes em membranas. 18C foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,05$) em mais de 60% a maioria dos isolados bacterianas potencialmente formadores de biofilmes. Já P1 reduziu a maioria dos isolados em mais de 50%. Tais resultados, são promissores para o uso de fagos em sistemas industriais. 18C e P1 demonstraram ser bons candidatos para a terapia fágica em membranas de nanofiltração, e suas aplicações em conjunto ou até mesmo em terapias combinadas com outros agentes antimicrobianos, poderiam surtir efeitos bem mais promissores para a prevenção e ou até mesmo eliminação de biofilmes que não puderam ser concluídas neste estudo.

Como perspectivas, estudos futuros deverão ser realizados para avaliar os efeitos de ambos os fagos caracterizados (18C e P1) na formulação de um coquetel fágico, assim como os outros fagos da coleção do LMA e que também foram utilizados neste trabalho.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEDON S.T Lysis from without, Bacteriophage, 1:1, 46-49, 2011.

ACKERMANN, H.W. 5500 Phages examined in the electron microscope. **Arch Virol**, 152: 227–243, 2007.

ADRIAENSSENS, E; SULLIVAN, M; KNEZEVIC, P; et al. Taxonomy of prokaryotic viruses: 2018-2019 update from the ICTV Bacterial and Archaeal Viruses Subcommittee. **Springer-Verlag GmbH Austria, part of Springer Nature** 2020

ALBINO, L.A.A; ROSTAGNO, M.H.; HÚNGARO, H.M.; MENDONÇA, R.C.S. Isolation, characterization, and application of bacteriophages for Salmonella spp. biocontrol in pigs. Foodborne pathogens and disease, 11(8): 602-609, 2014

ALBUQUERQUE, A.C; ANDRADE, A; NEVES, B. Biocorrosão – Da Integridade do Biofilme á Integridade do Material. **Corros. Prot. Mater.**, Vol. 33, nº 1-2. p 18-23. 2014.

ALMEIDA, G.M.F; SUNDBERG, L-R Lotta-Riina Sundberg Doutorado ^a Department of Biological and Environmental Science, Nanoscience Centre, University of Jyväskylä, Jyväskylä, Finland. The Lancet infectious diseases . Volume 20, , May 2020, Pages e90-e101.

Alvi, I.A., Asif, M., Tabassum, R. *et al.* RLP, a bacteriophage of the family *Podoviridae*, rescues mice from bacteremia caused by multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Virol* 165, 1289–1297 (2020).

ANDREWS-PFANNKUCH, C. et al. Hydroxyapatite-Mediated Separation of Double-Stranded DNA, Single-Stranded DNA, and RNA Genomes from Natural Viral Assemblages. **Appl Environ Microbiol** 76: 5039–5045. 2010.

Augustyniak, D.; Olszak, T.; Drulis-Kawa, Z. Vesículas de membrana externa (OMVs) de *Pseudomonas aeruginosa* fornecem resistência passiva, mas não sensibilização a fagos específicos de LPS. *Virus* **2022** , 14 , 12

Baldwin, D., Summer, N.S. Prevention and remediation of petroleum reservoir souring and corrosion by treatment with virulent bacteriophage, **Patent** number: US8168419 B2. 2012.

BATISTA, C. Petróleo. 2011. Disponível em: <https://www.todamateria.com.br/petroleo/> Acesso: 03 set.2020.

BATISTA, L.L.F. Estudo de comunidade microbiana de bactérias redutoras de sulfato *in vitro* com água produzida de petróleo. **Dissertação** de mestrado apresentada ao

programa de pós-graduação em biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia. 2013.

BASTIN, E.S. The presence of sulphate reducing bacteria in oil fields water **Science**, 63 , pp. 21-24, 1926.

Bertozzi Silva, J.; Tempestades, Z.; Sauvageau, D. Receptores de hospedeiro para adsorção de bacteriófagos. *FEM Microbiol. Lett.* 2016 , 363.

BIKARD, D.; MARRAFFINI, L. A. Innate and adaptive immunity in bacteria: mechanisms of programmed genetic variation to fight bacteriophages. **Curr Opin Immunol.** 24(1):15-20. 2012.

BICKLE, T. A. & KRUGER, D. H. Biology of DNA restriction. **Microbiol. Rev.** 57, 434–450 -1993

BRANCH, A; TRINH, T; CARVAJAL , G; LESLIE , G; HM COLEMAN ,H.M. et al. Hazardous events in membrane bioreactors – Part 3: impacts on microorganism log removal efficiencies J. Membr. Sci., 497 . pp. 514-523. 2016.

BREITBART, M; BONNAIN, C; MALKI, . et al. Phage puppet masters of the marine microbial realm. **Nature Microbiology** v 3, p754–766. 2018.

Bujak, K.; Decewicz, P.; Kaminski, J.; Radlinska, M. Identification, Characterization, and Genomic Analysis of Novel *Serratia* Temperate Phages from a Gold Mine. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21, 6709.

CANALS, O., SERRANO-SUÁREZ, A., SALVADÓ, H. *et al.* Effect of chlorine and temperature on free-living protozoa in operational man-made water systems (cooling towers and hot sanitary water systems) in Catalonia. **Environ Sci Pollut Res** 22, p. 6610–6618, 2015.

CARVALHO, A.S. Desenvolvimento e Aplicação da Tecnologia de Exclusão Biocompetitiva no Controle da Biossulfetogênese na Indústria de Petróleo na Região da Bahia. **Tese** de doutorado apresentado ao programa de pós graduação em biotecnologia da Universidade Federal da Bahia, Salvador, 144p.2010.

Casey, E.; Van Sinderen, D.; Mahony, J. In Vitro Characteristics of Phages to Guide ‘Real Life’ Phage Therapy Suitability. *Viruses* **2018**, 10, 163.

CHEN, Y-P.; ZHANG, P.; GUO, J-S.; FANG, F., Gao, X.; LI, C.. Functional groups characteristics of EPS in biofilm growing on different carriers. **Chemosphere**, vol:92 iss:6, pg:633 -638, 2013.

CHIBANI-CHENNOUFI, S.; BRUTTIN, A.; DILLMANN, M.L.; BRÜSSOW, H. Phage-Host Interaction: an Ecological Perspective. **Journal of Bacteriology**, vol. 186, n12, p. 3677–3686, June-2004.

CLOKIE, M. R. J.; KROPINSKI, A. M. Bacteriophage: Methods and Protocols. **Humana Press**, New York N.Y. 2011.

COESTER, S.E; CLOETE, T.E. Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems. **Critical Reviews in Microbiology**, v.31,13-232pp. 2005.

COSTA, T.R. Estudo de Biofilmes Microbianos em Membranas de Osmose Reversa. **Tese** de Doutorado Apresentado ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Do Instituto de Ciencias Biomedicas da Universidade de São Paulo. 161p. 2016.

CYPIONKA, H; WIDDEL, F; PFENNIG, N. Survival of sulfate-reducing bacteria after oxygen stress, and growth in sulfate-free oxygen-sulfide gradients. **FEMS Microbiology Ecology**, Volume 1, P 39–45, 1985

DANIS-WLODARCZYK; OLSZAK, k; ARABSKI, M.T; WASIK, G. et.al. Characterization of the newly isolated lytic bacteriophages KTN6 and KT28 and their efficacy against pseudomonas aeruginosa biofilm. **PLoS One**, 10. 2015.

DABROWSKA, K; SWITALA-JELEN, A; OPOLSKI, B. et al. Bacteriophage penetration in vertebrates **J. Appl. Microbiol.**, 98 (1) , pp. 7-13, 2005.

Davis, KM e Isberg, RR (2016), Definindo heterogeneidade dentro de populações bacterianas por meio de abordagens de célula única. *BioEssays*, 38: 782-790. <https://doi.org/10.1002/bies.201500121>

DEBARBIEUX, J.P. PIRNAY, G. VERBEKEN, D. DEVOS, M. MERABISHVILI, I. HUYS, O. Patey, D. Schoonjans, M. Vaneechoutte, M. Zizi, C. Rohde A bacteriophage journey at the European medicines agency **FEMS Microbiol. Lett.**, 363 (2) 2016.

Decewicz, P.; Golec, P.; Szymczak, M.; Radlinska, M.; Dziewit, L. Identification and Characterization of the First Virulent Phages, Including a Novel Jumbo Virus, Infecting *Ochrobactrum* spp. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2096. <https://doi.org/10.3390/ijms21062096>

DECKER, R.F.: The Growing Interface. Metallurgical Transactions A. **Biotechnology/Materials** Volume 17A, jan. 1986.

DION, M.B; OECHSLIN, F; MOINEAU, S. Phage diversity, genomics and phylogeny **Nature Reviews Microbiology** v18 , P125 – 138. 2020 .

DONLAN, R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. 9:881-90. 2002.

DRULIS-KAWA, Z.; MAJKOWSKA-SKROBEK, G.; MACIEJEWSKA, B. Bacteriophages and Phage-Derived Proteins – Application Approaches. **Current Medicinal Chemistry**, 22, 1757-1773, 2015.

DUTILH, B. E. et al. A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes. **Nat. Commun.** 5, 4498 . 2014.

EKINS, P.; VANNER, R.; J. FIREBRACE, J. Zero emissions of oil in water from offshore oil and gas installations: economic and environmental implications. **J. Clean. Prod.** 15 1302–1315, 2007.

Evans, T. J., Crow, M. A., Williamson, N. R., Orme, W., Thomson, N. R., Komitopoulou, E., et al. (2010). Characterization of a broad-host-range flagellum-dependent phage that mediates high-efficiency generalized transduction in, and between, *Serratia* and *Pantoea*. *Microbiology* 156, 240–247. doi: 10.1099/mic.0.032797-0

EYDAL, H S.C. et al. Bacteriophage lytic to *Desulfovibrio aespoeensis* isolated from deep groundwater. **Int. Soc. Microbial. Ecol. J.**, v. 3, p. 1139-1147, jun. 2009.

Fan N, Rong Qi, Min Yang, Isolation and characterization of a virulent bacteriophage infecting *Acinetobacter johnsonii* from activated sludge, *Research in Microbiology*, Volume 168, Issue 5, 2017, Pages 472-481.

FEBVRE, H.P; RAO, S; GINDIN, M; et al. Phage study: effects of supplemental bacteriophage intake on inflammation and gut microbiota in healthy adults **Nutrients**, v 11 , pp. 666, 2019.

FLEMMING, H. C. *Reverse Osmosis Membrane Biofouling*. Experimental Thermal and Fluid **Science**, 14: 382-391. 1997.

FLEMMING, H. C. *Biofouling in water systems - cases, causes and countermeasures*. **Applied Environmental Biotechnology**, 59: 629–640. 2002.

FRANCO, G.M. Estudo da Microbiota Associada a Torres de Resfriamento de uma Refinaria de Petróleo. Monografia de Especialização apresentada ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

FRANCO, B.D; LANDGRAF, M. Microbiologia de Alimentos. São Paulo: **Atheneu**, 182p. 1996.

GEETS, J; BORREMANS, B; DIELS, L; SPRINGAEL, D; VANGRONSVELD, D. et al. gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria **J. Microbiol. Methods**, 66 pp. 194-205. 2006. GIEG, L. M.; JACK, T. R.; FOGHT, J. M. Biological souring and mitigation in oil reservoirs. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 92, p. 263- 282, ago. 2011.

GITTEL, A; SØRENSEN, K.B; SKOVHUS, T.L; INGVORSEN, K; SCHRAMM A. Prokaryotic community structure and sulfate reducer activity in water from high-

temperature oil reservoirs with and without nitrate treatment Appl. **Environ. Microbiol.**, 75 (2009), pp. 7086-7096

Goldman G, Starosvetsky J, Armon R, Inhibition of biofilm formation on UF membrane by use of specific bacteriophages, *Journal of Membrane Science*, Volume 342, Issues 1–2, 2009, Pages 145-152.

GU, H., REN, D. Materials and surface engineering to control bacterial adhesion and biofilm formation: A review of recent advances. **Front. Chem. Sci. Eng.**, 8(1): 20–33, 2014.

Guo, Y.; Chen, P.; Lin, Z.; Wang, T. Caracterização de dois vírus de *Pseudomonas aeruginosa* vB_PaeM_SCUT-S1 e vB_PaeM_SCUT-S2. *Vírus* **2019** , 11 , 318. <https://doi.org/10.3390/v11040318>

GUO, Y; LI, T.Y; XIAO, K; WANG, X; XIE, E. Key foulants and their interactive effect in organic fouling of nanofiltration membranes. *Journal of Membrane Science* Volume 610, pp 118-252. 2020.

Gutiérrez, D., Briers, Y., Rodríguez-Rubio, L., Martínez, B., Rodríguez, A., Lavigne, R., et al. Papel da proteína do apêndice pré-pescoço (Dpo7) do fago vB_SepiS-philPLA7 como um agente anti-biofilme em espécies estafilocócicas. **Frente. Microbiol.** 6: 1315. 2015

GUPTA, R; PRASAD, Y. Efficacy of polyvalent bacteriophage P-27/HP to control multidrug resistant *Staphylococcus aureus* associated with human infections **Curr Microbiol**, 62 pp. 255-260. 2011

HAMILTON, W.A. Sulphate-reducing bacteria and anaerobic corrosion. *Annual Rev. Microbiol.* 39:195–969, 1985.

HARADA, L. K., SILVA, E. C., CAMPOS, W. F., DEL FIOL, F. S., VILA, M., DĄBROWSKA, K., KRYLOV, V. N., & BALCÃO, V. M. Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. **Microbiological Research**, 212–213(April), 38–58. 2018.

HARDY, J.A; HAMILTON, W.A. The oxygen tolerance of sulfate-reducing bacteria isolated from North Sea Waters. **Current Microbiology** v6, p 259–262. 1981

HENDRIX, R. W. Bacteriophages: Evolution of the Majority. **Theoretical Population Biology**, 61, 471-480, 2002.

HENRY, M; DEBARBIEUX, L. Tools from viruses: bacteriophage successes and beyond *Virology*, 434 (2) , pp. 151-161. 2012.

HIGA, J.S. Biofilmes Bacterianos: Vivendo em Comunidade. Departamento de Microbiologia Universidade de São Paulo. 2020. Disponível em: <http://microbiologia.icb.usp.br/cultura-e-extensao/textos-de->. Acesso em: 01 de maio de 2020.

Hyman, P.; Abedon, ST Ecologia de fagos da patogênese bacteriana. Em *Ecologia de Bacteriófagos* ; Abedon, ST, Ed.; Cambridge University Press: Cambridge, Reino Unido, 2008; pp. 353-385.

HUPSEL, A.L; BORGES, C.P; B, G.M. et.al. Combinação de processos com membranas para remoção de sulfato da água do mar para injeção em reservatórios de petróleo. *Eng. Sanit. Ambient.* Rio de Janeiro , v. 25, n. 2, p. 403-412, Mar. 2020.

HURWITZ, B. L. & SULLIVAN, M. B. The Pacific Ocean virome (POV): a marine viral metagenomic dataset and associated protein clusters for quantitative viral ecology. **PLoS One** 8, 1–12 . 2013.

HUSSAIN, A; HASAN, A; JAVID, A; QAZI, J.I. Exploited application of sulfate-reducing bacteria for concomitant treatment of metallic and non-metallic wastes: a mini review 3 **Biotech**, 6 (2016), p. 119

ICTV. 2019. Disponível: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> Acesso: 03 de agosto de 2020.

IWAKI, G.P. Sistemas de Tratamento de Água Produzida em Plataformas OFF-

SHORE. 2015. Disponível em: <https://www.tratamentodeagua.com.br/artigo/sistemas-de-tratamento-de-agua-produzida-em-plataformas-off-shore/> Acesso: 03 set. 2020.

Jonczyk, E.; Klak, M.; Miedzybrodzki, R.; Gorski, A. A influência de fatores externos em bacteriófagos-revisão. *Folia Microbiol.* **2011** , 56 , 191-200.

Jończyk-Matysiak, Norbert Łodej, Dominika Kula, Barbara Owczarek, Filip Orwat, Ryszard Międzybrodzki, Joanna Neuberg, Natalia Bagińska, Beata Weber-Dąbrowska & Andrzej Górski (2019): Factors determining phage stability/activity: challenges in practical phage application, Expert Review of Anti-infective Therapy, DOI: 10.1080/14787210.2019.1646126

KAUR, A; RISHI, V; SONI, S.K; RISHI, P. A novel multi-enzyme preparation produced from *Aspergillus niger* using biodegradable waste: a possible option to combat heterogeneous biofilms. **AMB Expr.** p 2-16. 2020.

KESIK-SZELOCH, A. et al. Characterising the biology of novel lytic bacteriophages infecting multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Virology** 10(100):1-12. 2013.

KHAL, A.E. isolamento e caracterização genômica de Bacteriófagos quanto ao seu potencial de uso Terapêutico em infecções causadas por Enterobactérias.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. 1-96. 2016.

KREMER, M.K. MEHNERT, D.U; MONEZI, T.A; MOURA, E. et al. Fagos de bactérias redutoras de sulfato em água de produção de um reservatório de petróleo *offshore*: método tentativo de concentração e purificação **Eng. Sanit. Ambient.**, Rio de Janeiro , v. 25, n. 4, p. 619-626. 2019.

LABRIE, S.J.; SAMSON, J. E.; MOINEAU, S. Bacteriophage resistance mechanisms. **Nature Reviews Microbiology**, vol. 8, n. 5, 317- 327, 2010

LEE, JS ; RAY, RI ; Comparação Little, BJ de Key West e águas do mar do Golfo Pérsico . Em *CORROSION 2007* ; **NACE International** : Nashville, TN , 2007 .

LEGNER, Carla. Nanofiltração ganha mercado em aplicações offshore. Revista Meio Filtrante. 62.ed., 2013. Disponível em: . Acesso em: 27 fev. 2015.

LEQUETTE, Y., BOELS, G., CLARISSE, M., FAILLE, C. Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates samples in the food industry. **Biofouling**. V.4, p.421-431, 2010.

LI, X; MBADINGA, S.M; LIU, J.F L. ZHOU, S.-Z. ET AL. Microbiota and their affiliation with physiochemical characteristics of different subsurface petroleum reservoirs *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 120 (2017), pp. 170-185

LIU, F., CHANG, X., YANG, F. *et al.* Effect of oxidizing and non-oxidizing biocides on biofilm at different substrate levels in the model recirculating cooling water system. **World J Microbiol Biotechnol** 27, 2989–2997, 2011.

LOH, B; KUNH, A; LEPTLHN, S. The fascinating biology behind phage display: filamentous phage assembly. **Molecular Microbiology** v 111(5), p 1132–1138. 2019

LIU, Fang; LU, Xianhui; YANG, Wei; LU, Jinjin; ZHONG, Huiyun; CHANG, Xin; ZHAO, Chaocheng. Optimizations of inhibitors compounding and applied conditions in simulated circulating cooling water system, *Desalination*, Volume 313, Pages 18-27, 15 March, 2013.

LU, T.K; COLLINS J.J. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007.

LUONG, T; SALABARRIA, A-C; ROACH, D. Phage Therapy in the Resistance Era: Where Do We Stand and Where Are We Going? **Clinical Therapeutics** 2020

MACHALELA, A.A. Uso de bacteriófagos como alternativa de conservação de leite em Moçambique. **Dissertação** de mestrado apresentada à Universidade Federal de Viçosa. 79p. 2016.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. Microbiologia de Brock. 12. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160 p.

Madigan MT Martinko JM Stahl DA et al. *Brock Biologia de Microrganismos* São Francisco Benjamin Cummings 2012

MAGALHAES, R.S. Estudo de bactérias com atividade antagonista a bactérias redutoras de sulfato oriundas de amostras de água produzida de poços de petróleo. **Dissertação** de mestrado apresentada ao Programa de Pósgraduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Bahia, 60p.2014.

Marei E.M Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* and its virulent bacteriophages Pak. J. Biol. Sci., 23 (2020), pp. 491-500, 10.3923/pjbs.2020.491.500

Matsushita Kenshi, Jumpei Uchiyama, Shin-ichiro Kato, Takako Ujihara, Hiroshi Hoshiba, Shigeyoshi Sugihara, Asako Muraoka, Hiroshi Wakiguchi, Shigenobu Matsuzaki, Morphological and genetic analysis of three bacteriophages of *Serratia marcescens* isolated from environmental water, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 291, Issue 2, February 2009, Pages 201–208.

MATIN, A.; KHAN, Z.; ZAIDI, S.M.J.; BOYCE, M.C. Biofouling in reverse osmosismembranes for seawater desalination: phenomena and prevention. *Desalination*, v. 281, p. 1–16, 2011.

MATTILA-SANDHOLM, T; WIRTANEN, G. Biofilm Formation in the Industry: a Review. **Food Ver. Int.**, 8, 573-603. 1992.

MEIRELES, A.; BORGES, A.; GIAOURIS, E.; SIMÕES, M. The current knowledge on the application of anti-biofilm enzymes in the food industry. **Food Research International**, 86, 140–146, 2016.

MIRANDA, A. Biofilme: O Inimigo Invisível. Naace/ CME. 2020. Disponível em: <http://nascecmecme.com.br/biofilme-o-inimigo-invisivel/>. Acesso em: 02 de maio de 2020.

Moak, M. e Molineux, IJ Atividades hidrolíticas de peptidoglicanos associadas a vírions bacteriófagos. **Mol. Microbiol.** 51, 1169–1183. 2004.

MORADI, A; MOSADDEGHI, M.R; CHAVOSHI, A. et al. Effect of crude oil-induced water repellency on transport of *Escherichia coli* and bromide through repacked and physically-weathered soil columns. **Environmetal Pollution.** v. 255, pp 113-230. 2019.

NAZAR, J. Bacterial biofilms. **Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello**; 67: 61-72, 2007

Narenkumar,J M.S. AlSalhi, A. ArulPrakash, S. Abilaji, S. Devanesan, A. Rajasekar, A. A. Alfuraydi. Impact and role of bacterial communities on biocorrosion of metals used in the processing industry. **ACS Omega**,v 4 pp. 21353-21360,.2019

NICOLINI, J.V. Formulação de água de injeção por nanofiltração para recuperação avançada do petróleo. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-

graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro.p.279.2017.

NG, W.L; PEREZ, L; CONG, J. Broad spectrum pro-quorum-sensing molecules as inhibitors of virulence in vibrios. **PLoS Pathog.** V.8. 2012.

O'FLAHERTY, S.; ROSS, RP.; COFFEY, A.. Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria. **FEMS microbiology reviews**, 33: 801-819, 2009.

OLIVEIRA, V.R. Avaliação da Etapa de Tratamento Físico-Químico da Água do Mar com Vistas à Dessalinização Para Uso em Usinas Termoelétricas. In: XXI **Congresso Brasileiro de Engenharia Química – COBEQ 2016**, Fortaleza/CE, 25 a 29 de setembro, 2016.

O'TOOLE G; KAPLAN HB; KOLTER R. Biofilm formation as microbial development. **Ann Rev Microbiol** 54: 49–79. 2000.

PAUL, J. Prophages in marine bacteria: dangerous molecular time bombs or the key to survival in the seas? **ISME J.** 2, 579–589 2008.

PASUMARTHI, R; CHANDRASEKARAN, S; MUTNURI, S. Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia fergusonii* isolated from the Goan coast. V76, pg 276-282. 2013.

PETROBRAS. Exploração e Produção de Petróleo e Gás. 2020. Disponível em: <https://petrobras.com.br/pt/nossas-atividades/areas-de-atuacao/exploracao-e-producao-de-petroleo-e-gas/>. Acesso: 03 set.2020.

POLTAK, S. R. and COOPER, V. S. Ecological succession in long-term experimentally evolved biofilms produces synergistic communities. **The ISME Journal**, 5, 369–378, 2011

PONNUSAMY, K. et al. (2(5h)-furanone: a prospective strategy for biofouling-control in membrane biofilm bacteria by quorum sensing inhibition. **Brazilian Journal of Microbiology**, 41: 227-234.2010.

POTTKER, E.S. Genômica e caracterização fenotípica de bacteriófagos líticos para biocontrole de Salmonella entérica. Dissertação de mestrado apresentada do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação da Universidade dePasso Fundo (UPF).2016.

RAWAT, J; KHANDELWAL, A; SHARMA, N; TYAGI, S. Effect of Sulphate reducing bacterial-biofilm isolated from refinery cooling water system and sonication on corrosion of carbon steel. J. Mater. **Environ. Sci.** P. 596-604. 2016

ROCHA, C.H.L; MUNIZ, G.S; ROCHA, F.M.G. Identificação de Bactérias Presentes em Biofilmes de Superfícies Metálicas. **Rev. Investig, Bioméd**, Vol. 10. p 172-180. 2018.

Rodríguez-Rubio, L., Martínez, B., Donovan, DM, Rodríguez, A., e García, P. Hidrolases de peptidoglicanos associadas ao vírion bacteriófago: novos enzimáticos em potencial. **Crit. Rev. Microbiol.** 39, 427–434.2013

RODRÍGUEZ-RUBIO, L., GUTIÉRREZ, D., DONOVAN, D.M., MARTÍNEZ, B., RODRÍGUEZ, A., GARCÍA, P. Phage lytic proteins: biotechnological applications beyond clinical antimicrobials. **Crit. Rev. Biotechnol.** 36 (3), 542–552. 2016.

ROSA, A. J., CARVALHO, R. S., XAVIER, J. A. D. Engenharia de Reservatórios de Petróleo. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2006.

ROSSI, L.P; ALMEIDA, R.c. . Bacteriophages for control of bacterial pathogens in foods. 69, 2, pp. 2010.

Roumagnac, P., Lett, JM., Fiallo-Olivé, E. *et al.* Estabelecimento de cinco novos gêneros na família *Geminiviridae* : *Citlodavirus* , *Maldovirus* , *Mulcrilevirus* , *Opunvirus* e *Topilevirus* . *Arco Virol* 167 , 695-710 (2022). <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05309-2>

SANTOS, J.C; LOPES, D.R; SILVA, J.D. et al. Diversity of sulfate-reducing prokaryotes in petroleum production water and oil samples. **International Biodeterioration & Biodegradation** v 151, p1-6. 2020.

Sass, P. e Bierbaum, G., Atividade lítica das endolisinas do bacteriófago recombinante $\phi 11$ e $\phi 12$ em células inteiras e biofilmes de *Staphylococcus aureus* . **Appl. Environ. Microbiol.** 2007

SCHACHTER, B. Slimy business-the biotechnology of biofilms. *Nat Biotechnol*, v.21. n.4. p 361-365. 2003.

SHI X; XIE N. and GONG J., Recent Patents on Corrosion **Science.** v.1. p. 118. 2011.

SILVA, P.M.R. Reinjeção de água produzida: qualificação da água e inovações tecnológicas. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia de Petróleo da Universidade Federal Fluminense. P.107.2015.

SILVA, T.G; SILVA, I.E; ARGOLO, L.A; SILVA, G.S. Remoção de íons de sulfato da água oceânica e de injeção através da nanofiltração. **Ciências exatas e tecnológicas.** Maceió. v. 3. n.1. p. 131-140. 2015.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J.; A review of current and emergent biofilm control strategies. **Food Science and Technology** 43, 573–583, 2010

SNATURAL. Tipos de membranas de filtração. 2018. Disponível em: <https://www.snatural.com.br/membranas-ultrafiltracao-filtracao-agua/#Acesso>: 29 ago.2020.

SOARES, S.S. Biodiversidade de Amebas de Vida Livre e Bactérias Associadas a Amebas em Reservatórios de Água de Torres de Resfriamento. Dissertação de Mestrado UFRGS. Porto Alegre. 2016. 67p

SOUSA, K.A; CAMMAROTA, M.C; SERVULO, Eliana E.C. Efeito da aplicação de nitrato na redução biogênica de sulfeto sob diferentes concentrações iniciais de bactérias redutoras de nitrato e sulfato. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 33, n. 2, p. 273-278, 2010 .

SOUZA, M.V.D. Exploração de Enzimas, Fármacos Antimicrobianos e Biossurfactantes Livres e Encapsulados em Lipossomas contra Biofilmes de Bactérias Isoladas de Sistemas de Resfriamento de Água. **Tese** de Doutorado Departamento de Microbiologia UFMG. 2017.298p.

SILVA, P.M.R. Reinjeção de água produzida: qualificação da água e inovações tecnológicas. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia de Petróleo da Universidade Federal Fluminense. P.107.2015.

TARCHITZKY, j; RIMON, A; KENIG, E; DOSORETZ, C.G; CHEN, Y. Biological and chemical fouling in drip irrigation systems utilizing treated wastewater. **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**. P 1-12. 2013.

THALLINGER, B., PRASETYO, E. N., NYANHONGO, G. S., & GUEBITZ, G. M.. Antimicrobial enzymes: An emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms. **Biotechnology Journal**, 8(1), 97–109, 2013.

Scarascia Giantommaso, Yap Scott A., Kaksonen Anna H., Hong Pei-Ying Bacteriophage Infectivity Against *Pseudomonas aeruginosa* in Saline Conditions *Frontiers in Microbiology*, V 9,2018.

Schmelcher M, Powell AM, Camp MJ, et. al. Synergistic streptococcal phage λSA2 and B30 endolysins kill streptococci in cow milk and in a mouse model of mastitis. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016 Oct; 99:8475-86. doi: 10.1007/s00253-015-6579-0; PMID: PMC4573782; PMID: 2589509

S.J. VARJANI, E. GNANSOUNOU. Microbial dynamics in petroleum oilfields and their relationship with physiological properties of petroleum oil reservoirs *Bioresour. Technol.*,v 245, pp. 1258-1265, 2017.

VEIL, J. A.; PUDER, M. G.; ELLCOCK, D.; REDWEILK., Jr.. R. J. A White Paper Describing Produced water From Production of Crude Oil , Natural Gas, and Coal Bed Methane. U.S. Department of Energy National Energy Technology Laboratory, 2004.

Vieira, M.S, Silva, J.D, Ferro C, Cunha, P.C, Vidigal,P.M, et al.A highly specific *Serratia*-infecting T7-like phage inhibits biofilm formation in two different genera of the Enterobacteriaceae family, *Research in Microbiology*, volume 172, Issue 6,2021.

VISPO, N.S; IZAGUIRRE, Y.P. Bacteriófagos: de la terapia con fagos a la biología combinatoria. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Biotecnología Aplicada;18:135-147. 2001.

Vries, H.J, Alfons J.M. Stams, Caroline M. Plugge, Biodiversity and ecology of microorganisms in high pressure membrane filtration systems, Water Research, Volume 172, 2020.

XAVIER, J.B; PICIOREANU, C; ALMEIDA, J.S; LOOSDRECHT, M.C.M. Monitorização e Modelação da Estrutura de Biofilmes. **Boletim de Bioetnologia**. 2005.13p.

Wawer, C e Muyzer, G. Genetic diversity of *Desulfovibrio* spp. in environmental samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of {NiFe} hydrogenase gene fragments. Applied and Environmental Microbiology, v. 61, p. 2203-2210. 1995.

WALDOR, M.K; FRIEDMAN, D.I; ADHYA, S.L. *Phages : their role in bacterial pathogenesis and biotechnology*, Washington, D.C.: **ASM Press**. 2005

Weber, L.; Jansen, M.; Krüttgen, A.; Buhl, E.M.; Horz, H.-P. Tackling Intrinsic Antibiotic Resistance in *Serratia marcescens* with a Combination of Ampicillin/Sulbactam and Phage SALSA. *Antibiotics* **2020**, 9, 371.

WEINBAUER, M.G. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS microbiology reviews*28: 127-181. 2004

WIKIEL, A; DATSENCO, I; VERA, M; SAND, W. Impact of *Desulfovibrio alaskensis* biofilms on corrosion behaviour of carbon steel in marine environment. **Bioelectrochemistry**. v 97, pp 52-60. 2013.

Wittebole, S. de Roock, S.M. Opal A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence*, 4 (8) (2013), pp. 1-10.

WU. B; WANG, R; FANE, A.G. The roles of bacteriophages in membrane-based water and wastewater treatment processes: **A review. Water Research** v 110, pp 120-132, 2017

YEON , K.M; CHEONG , W.S; HS OH; LEE W.N; HWANG , B.K; LEE, C.H; BEYENAL , H.Z; LEWANDOWSKI, Z. Sensor de quorum: um novo paradigma de controle de bioincrustação em um biorreator de membrana para tratamento avançado de águas residuais. **Environ. Sci. Technol.** , 43 (2009) , pp. 380 - 385

Zhang , J AM Ormala-Odegrip , J. Mappes , J. Laakso **Efeitos de cima para baixo de um bacteriófago lítico e protozoários em bactérias nas fases aquosa e de biofilm** Eco Evol , 4 (2014) , pp. 4444 - 4453

ZHONG, Y.; CHEN, F.; WILHELM, S.W.; POORVIN, L.; HODSON, R.E. Phylogenetic diversity of marine cyanophage isolates and natural virus communities as revealed by sequences of viral capsid assembly protein gene g20. **Appl Environ Microbiol**; 68:1576-84, 2002.

ZHOU, L; WANG, D.W; ZHANG, S.L; et al. Functional microorganisms involved in the sulfur and nitrogen metabolism in production water from a high-temperature offshore petroleum reservoir. **International Biodeterioration & Biodegradation**. V.154. p.10.2020.

9. ANEXOS

9.1 Estoque de fagos do LMA em etapas de purificação e titulação

Bacteriófago	Bactéria Hospedeira	Morfologia das placas de lise
P1- RLI17 (<i>Pseudomonas aeruginosas</i>)	RLI17 (<i>Pseudomonas aeruginosas</i>)	Placa de lise grande e opaca
P2- RLI17 (<i>Pseudomonas aeruginosas</i>)	RLI17(<i>Pseudomonas aeruginosas</i>)	Placa de lise com ponto límpido pequeno no centro e halo grande
P3- RLI17 (<i>Pseudomonas aeruginosas</i>)	RLI17(<i>Pseudomonas aeruginosas</i>)	Placa de lise grande límpida
P4M- RLI17 (<i>Pseudomonas aeruginosas</i>)	RLI17(<i>Pseudomonas aeruginosas</i>)	Placa de lise média, com halo médio e límpido no centro
P4P	RLI17(<i>Pseudomonas aeruginosas</i>)	Placa de lise com ponto límpido médio no centro e halo médio
17.1.1	RLI17(<i>Pseudomonas aeruginosas</i>)	Placa de lise grande, redonda e opaca
17.1.2	RLI17(<i>Pseudomonas aeruginosas</i>)	Placa de lise média e translúcida
17.1.4	RLI17(<i>Pseudomonas aeruginosas</i>)	Placa de lise média com halo redondo e ponto translúcido
17.2	RLI17(<i>Pseudomonas aeruginosas</i>)	Placa de lise pequena com halo redondo e centro translúcido
18.1.1	RLI17(<i>Pseudomonas aeruginosas</i>)	Placa de lise grande, com halo bem fino e centro translúcido
18.1.2	RLI17(<i>Pseudomonas aeruginosas</i>)	Placa de lise média, com halo característico e ponto translúcido
18.1.3	RLI17(<i>Pseudomonas aeruginosas</i>)	Placa de lise média e translúcida, sem halo
18.1.4	RLI17(<i>Pseudomonas aeruginosas</i>)	Placa de lise média e opaca
18.2.2	RLI17(<i>Pseudomonas aeruginosas</i>)	Placa de lise pequena, com halo e centro translúcido

18.2.4	RLI17(<i>Pseudomonas aeruginosas</i>)	Placa de lise pequena e translúcida
18C	RLI17(<i>Pseudomonas aeruginosas</i>)	Placa de lise pequena límpida e com um h Lateral ao ponto límpido.
P1	RLI33	Placa de lise pequena redonda e translúcida
P2	RLI33	Placa de lise grande e opaca PL com grande opaca e ponto translucido no centro
B1	RLA12	Placa de lise grande e fosca
B2	RLA12	Placa de lise límpida e média
B3	RLA12	Placa de lise grande e límpida
B4	RLA12	Placa de lise grande e fosca
B6	RLA12	Placa de lise pequena e translúcida
P1	PLA5	Placa de lise grande opaca com ponto opa centro
P2	PLA5	Placa de lise pequena opaca com borda re
P3	PLA5	Placa de lise pequena opaca
10	PLA5	Placa de lise pequena e translúcida
11.1.1	PLA5	Placa de lise média e translúcida
11.1.2	PLA5	Placa de lise grande, opaca e ponto opa centro.
11.2.1	PLA5	Placa de lise média e opaca
11.2.2	PLA5	Placa de lise grande opaca
12.1	PLA5	Placa de lise pequena, opaca e com central opaco.
12.2.1	PLA5	Placa de lise pequena e opaca
12.2.2	PLA5	Placa de lise média e translúcida
12.2.3	PLA5	Placa de lise grande e translúcida