

Sanna Maria Sillankorva

**Utilização de Bacteriófagos no Controlo de  
Células Suspensas e Biofilmes de  
*Pseudomonas fluorescens***

Dissertação apresentada para a obtenção do grau  
de Mestre em Tecnologia do Ambiente

Tese realizada sob a orientação de:

Doutora Joana Azeredo

Professora Auxiliar



**Universidade do Minho**

Escola de Engenharia

Departamento de Engenharia Biológica

2004

## *Agradecimentos*

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram a realizar este trabalho, em particular:

À **Dra. Joana Azeredo**, minha orientadora, pela excelente orientação, confiança, dedicação e disponibilidade que sempre manifestou, incentivando-me sempre nos momentos mais complicados.

À **Dra. Maria João Vieira**, pela oportunidade que me proporcionou para participar no projecto “Controlo biológico de biofilmes”.

I would like to express my gratitude to Professor **Ian Sutherland** for the knowledge and suggestions given to the accomplishment of this work.

À **Dra. Rosário Oliveira**, pelo apoio dado na revisão de *abstracts* e artigos.

À **Mariana** e à **Salomé**, pela amizade sincera e apoio incondicional a nível profissional e pessoal. Obrigada por partilharam comigo as alegrias e tristezas nestes anos.

Aos colegas do LMA **Ana Lobo**, **Lívia**, **Lúcia**, **Manuel Simões**, **Nuno Azevedo**, **Nuno Cerca**, **Pilar**, **Sílvia**, obrigada pelo óptimo convívio.

À **Olívia** e a aos colegas de voleibol do DEB, pelos momentos de alegria às quartas-feiras.

À Fundação da Ciência e Tecnologia (FCT) pela bolsa concedida no âmbito do projecto POCTI/BIO/35683/99 "Controlo Químico e Biológico de Biofilmes".

Não podia deixar de agradecer às pessoas mais importantes da minha vida, **Äiti**, **Isä**, **Sami**, **Minna** + *perhe* tuhannet kiitokset teille avusta ja kannatuksesta näinä viime vuosina e **Álvaro** kiitos rakkaudestasi.

## ***Resumo***

Os ambientes industriais são propícios à formação de biofilmes devido à presença de microrganismos e às condições favoráveis para o seu desenvolvimento. Os biofilmes são responsáveis por perdas económicas elevadas e alterações da qualidade dos produtos industriais. Devido a estes factores têm surgido diversos estudos com o intuito de se obter a melhor metodologia para a sua eliminação. A maior parte destes estudos baseia-se na utilização de agentes químicos que causam impactos ambientais adversos devido à sua toxicidade e para além disso têm demonstrado fraca eficiência na remoção de biofilmes das superfícies industriais. Assim, é fundamental investigar agentes alternativos para a erradicação de biofilmes.

Neste trabalho estudou-se a utilização de vírus bacterianos, os bacteriófagos (fagos), na eliminação de células de *Pseudomonas fluorescens*. Os fagos são ubíquos na natureza, bastantes específicos e não tóxicos para o Homem e animais.

Esta dissertação encontra-se dividida em diferentes capítulos. Após uma breve introdução teórica sobre fagos e biofilmes (Capítulo 1), encontram-se descritos, no Capítulo 2, todos os métodos desenvolvidos e utilizados neste trabalho. Seguem-se os capítulos referentes aos estudos de infecção fágica realizados com células suspensas (Capítulo 3), biofilmes (Capítulo 4) e células aderidas a superfícies (Capítulo 5). A finalizar encontram-se as conclusões e propostas para trabalho futuro (Capítulo 6).

De acordo com os resultados deste trabalho, os fagos, sob condições óptimas e na presença de hospedeiros com qualidade (crescidos à temperatura óptima e meio de crescimento óptimo) são bastante eficientes na remoção de biofilmes no estado inicial de formação (células aderidas a superfícies) e biofilmes maduros, tendo-se obtido percentagens de remoção acima dos 80%. No entanto, verificou-se que a infecção fágica é condicionada por diversos factores, tais como a temperatura, fase e meio de crescimento do hospedeiro, meio de infecção e concentração de fago. Este facto poderá limitar a aplicabilidade destes agentes biológicos no controlo bacteriano em ambientes industriais devido à diversidade das condições ambientais.

## ***Abstract***

In industrial environments the development of biofilms is favorable due to the presence of microorganisms and the existing conditions. These biofilms are responsible for severe economic losses and alterations of the industrial products quality. Due to these factors, several studies have been made in order to develop a good methodology for their removal. The majority of these studies involve the use of chemical agents that are responsible for negative environmental impacts due to their toxicity and have poor biofilm removal action. Therefore, it is of utmost importance the investigation of alternative strategies to eradicate biofilms.

In this study, bacteriophages (phages) were used to eliminate *Pseudomonas fluorescens* cells. Phages are ubiquitous in nature, highly specific and non-toxic for humans and animals.

This Thesis is divided in different chapters. After a brief introduction to the phage subject, the methods developed and used in this work are described (Chapter 2). This follows of the chapters considering phage infection of planktonic cells (Chapter 3), biofilms (Chapter 4) and biofilms in the early stage of formation (Chapter 5). Finally Chapter 6 consists of the conclusions and proposals for future work.

According to the results of this work, phages are very effective in the removal of planktonic cells, biofilms in the early stage of formation and 5 days old biofilms, when optimal conditions are gathered. In optimal conditions the removal percentages obtained were higher than 80%. Nevertheless, phage infection of cells revealed to be conditioned due to several factors, such as temperature, growth stage and media, infection media and phage concentration. Biological control of *P. fluorescens* cells using phages is limited by these factors.

## *Índice Geral*

<i>Agradecimentos</i>	i
<i>Resumo</i>	ii
<i>Abstract</i>	iii
<i>Índice Geral</i>	iv
<i>Índice de Figuras</i>	vii
<i>Índice de Tabelas</i>	x
<i>Lista de Siglas</i>	xi
Capítulo 1 - Introdução Geral	1
1.1. BACTERIÓFAGOS	1
1.1.1 Descoberta dos Bacteriófagos	1
1.1.2 Classificação de Fagos	3
1.1.3 Etapas do Ciclo de Replicação de Fagos	5
1.1.4 Estratégia de Sobrevivência dos Fagos	11
1.1.5 Mutação dos Hospedeiros	12
1.1.6 Ecologia dos Fagos	12
1.1.7 Terapia fágica	13
1.2. BACTÉRIAS	14
1.2.1 Bactérias Formadoras de Biofilmes	14
1.2.2 Teorias de Formação de Biofilmes	16
1.2.3 Composição dos Biofilmes	18
1.2.4 Estrutura de Biofilmes	19
1.3. BIBLIOGRAFIA	21
CAPÍTULO 2 - MÉTODOS EXPERIMENTAIS DESENVOLVIDOS E IMPLEMENTADOS	24
2.1. MATERIAIS E MÉTODOS	26
2.1.1 Microrganismo e fago	26
2.1.2 Purificação do Fago	26
2.1.3 Métodos para Quantificação de Lise Celular	27
2.1.4 Métodos para a Avaliação da Replicação Fágica	28

2.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
2.2.1 Avaliação de Lise Celular – Validação do Método de ATP	33
2.2.2 Avaliação da Replicação do Fago	38
2.3. BIBLIOGRAFIA	45
<b>CAPÍTULO 3 - INFECÇÃO FÁGICA DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO</b>	<b>46</b>
3.1. MATERIAIS E MÉTODOS	48
3.1.1 Efeito do Meio de Infecção	48
3.1.2 Efeito da Temperatura	48
3.1.3 Efeito da Fase de Crescimento	49
3.1.4 Efeito do Meio de Crescimento	49
3.1.5 Proteínas da Membrana Externa	50
3.1.6 Análise Estatística	53
3.2. RESULTADOS	54
3.2.1 Efeito do Meio de Infecção	54
3.2.2 Efeito da Temperatura	54
3.2.3 Efeito da Fase de Crescimento Celular	60
3.2.4 Efeito da Meio de Crescimento	62
3.3. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	65
3.4. BIBLIOGRAFIA	69
<b>CAPÍTULO 4 - INFECÇÃO FÁGICA DE BIOFILMES</b>	<b>71</b>
4.1. MATERIAIS E MÉTODOS	74
4.1.1 Formação de Biofilme	74
4.1.2 Determinação do Número de Células dos Biofilmes	75
4.1.3 Infecção Fágica de Biofilmes	75
4.1.4 Análise Estatística	76
4.2. RESULTADOS	77
4.2.1 Infecção de Biofilmes Crescidos Durante 5 e 13 Dias	77
4.2.2 Biofilmes Formados e Infectados em Condições Estáticas e Dinâmicas	77
4.2.3 Efeito da Temperatura de Infecção	79
4.2.4 Efeito da Temperatura de Crescimento	80
4.3. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	83
4.4. BIBLIOGRAFIA	86
<b>CAPÍTULO 5 - INFECÇÃO FÁGICA DE CÉLULAS ADERIDAS</b>	<b>89</b>
5.1. MATERIAIS E MÉTODOS	91
5.1.1 Célula de Fluxo	91
5.1.2 Adesão de Células	92

5.1.3 Infecção de Células Aderidas	92
5.1.4 Recolonização da Superfície	92
5.1.5 Processamento das Imagens	93
5.1.6 Cálculo do Número de Células por cm <sup>2</sup>	94
5.1.7 Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)	95
5.1.8 Microscopia de Epifluorescência	96
5.2. RESULTADOS	97
5.2.1 Adesão Celular de <i>P. fluorescens</i> a Superfícies de Vidro	97
5.2.2 Infecção Fágica de Células Aderidas	98
5.2.3 Recolonização da Superfície	105
5.3. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	106
5.4. BIBLIOGRAFIA	108
CAPÍTULO 6 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO	110

## *Índice de Figuras*

Figura 1.1 - Classificação dos fagos com base na morfologia e no tipo de ácido nucleico (Ackerman <i>et al.</i> , 1992) .....	3
Figura 1.2 - Adsorção do fago a uma célula hospedeira e consequente penetração por injeção do ácido nucleico (Pelczar <i>et al.</i> , 1993) .....	7
Figura 1.3 - Tipos de ciclos fágicos. Modelo adaptado de Weinbauer (2003) .....	8
Figura 1.4 - Representação gráfica de uma curva de <i>one-step-growth</i> para um fago lítico como o fago T4 .....	11
Figura 1.5 – Bactéria da família das <i>Pseudomonadaceae</i> .....	15
Figura 1.6 – Esquema representativo da formação de biofilmes .....	18
Figura 2.1 - Valores de ATP (RLU) obtidos para diferentes títulos de fago (PFU/ml) .....	34
Figura 2.2 - Valores de ATP (RLU) obtidos para diferentes concentrações de células crescidas a 4°C, 26°C, 37°C e durante 42h e 72h .....	35
Figura 2.3 - Concentrações de ATP (µg/ml) após sonicação de diferentes concentrações de células crescidas a 4°C, 26°C, 37°C e durante 42h e 72h .....	36
Figura 2.4 - Variação de ATP (µg/g <sub>ps</sub> ) e D.O (640nm) durante o período de infecção fágica .....	37
Figura 2.5 - Valores de D.O. e ATP (µg/g <sub>ps</sub> ) obtidos durante a infecção a 26°C de uma suspensão celular de <i>P. fluorescens</i> crescida a 37°C .....	38
Figura 2.6 - Diferentes diluições de uma amostra contendo fagos .....	39
Figura 2.7 – Espectro de uma amostra de ADN de esperma de salmão corada com SYBR Green I .....	41
Figura 2.8 - Curvas de calibração de ADN de esperma de salmão com SYBR Green I.....	41
Figura 2.9 - Actuação da DNase I na presença de Mg <sup>2+</sup> .....	42
Figura 2.10 – Relação entra a área do pico 1 e a concentração de fago antes e após a actuação da DNase I .....	42
Figura 2.11 - Relação entra a área do pico 2 e a concentração de fago antes e após a actuação da DNase I.....	42



Figura 2.12 - Relação entre a área do pico 3 e a concentração de fago antes e após a actuação da DNase I .....	43
Figura 3.1 - Infecção fágica de suspensões em diferentes meios de infecção .....	54
Figura 3.2 - Infecção fágica a 4°C, 26°C e 37°C de culturas de <i>P. fluorescens</i> crescidas às mesmas temperaturas (4, 26 e 37°C) .....	55
Figura 3.3 - Infecção fágica a 4°C, 26°C e 37°C de culturas de <i>P. fluorescens</i> crescidas a 26°C .....	57
Figura 3.4 - Efeito da temperatura na actividade do fago .....	58
Figura 3.5 - Infecção fágica a 26°C de culturas de <i>P. fluorescens</i> crescidas a 4°C, 26°C e a 37°C .....	59
Figura 3.6 - Electroforese em gel de poliacrilamida das proteínas da membrana externa de células crescidas a 4°C (coluna 1), 26°C (coluna 2) e a 37°C (coluna 3) .....	60
Figura 3.7 - Diminuição da D.O. durante o período de infecção fágica de células na fase exponencial (coluna 1), estacionária (coluna 2) e de declínio (coluna 3) .....	61
Figura 3.8 - Electroforese em gel de poliacrilamida das proteínas da membrana externa de células na fase exponencial (coluna 1), estacionária (coluna 2) e de declínio (coluna 3) ....	62
Figura 3.9 - Electroforese em gel de poliacrilamida das proteínas da membrana externa de células crescidas em meio MCN (coluna 1) e em meio MG (coluna 2) .....	63
Figura 4.1 - Formação de biofilme em microplacas de 6 poços .....	74
Figura 4.2 - Número de células lisadas em biofilmes de <i>P. fluorescens</i> formados e infectados a 4°C, 26°C e a 37°C .....	77
Figura 4.3 - Número de células lisadas em biofilmes de <i>P. fluorescens</i> formados e infectados em condições dinâmicas .....	78
Figura 4.4 - Número de células lisadas em biofilmes de <i>P. fluorescens</i> formados e infectados em condições estáticas .....	78
Figura 4.5 - Número de células lisadas em biofilmes de <i>P. fluorescens</i> formados a 26°C e infectados a 4°C, 26°C e a 37°C .....	79
Figura 4.6 - Biofilmes de <i>P. fluorescens</i> formados a 4°C, 26°C e a 37°C .....	80
Figura 4.7 - Número de células lisadas em biofilmes de <i>P. fluorescens</i> formados a 4°C, 26°C e a 37°C e infectados 26°C .....	81
Figura 4.8 - Infecção a 26°C de biofilmes de <i>P. fluorescens</i> formados a 26°C .....	82
Figura 5.1 - Célula de fluxo utilizada para a adesão de células . .....	90
Figura 5.2 – Fotografia da célula de fluxo utilizada no trabalho experimental .....	91
Figura 5.3 - Sistema utilizado para a adesão de células . .....	91

Figura 5.4 - Imagens do fundo e de uma superfície com células (A) e passos da sub-rotina <i>Image Math</i> utilizados para melhorar a qualidade da imagem (B) .....	93
Figura 5.5 - Exemplos de imagens após as sub-rotinas <i>Intensity Treshold</i> (A) e <i>Measure Objects</i> (B) do <i>Sigma Scan Pro 5</i> .....	94
Figura 5.6 - Imagens de células de <i>P. fluorescens</i> aderidas ao longo do tempo a uma superfície de vidro após tratamento de imagem com o <i>Sigma Scan Pro 5</i> .....	97
Figura 5.7 - Cinética de adesão de células de <i>P. fluorescens</i> a uma superfície de vidro .....	97
Figura 5.8 - Infecção fágica de células de <i>P. fluorescens</i> aderidas a uma superfície de vidro: antes da infecção fágica (A), após um determinado período de tempo de infecção (B) e no final da infecção fágica (C) .....	98
Figura 5.9 - Cinética de remoção de células aderidas, após infecção fágica (PFU/ml = $1 \times 10^{10}$ ) .....	99
Figura 5.10 - Cinética de remoção de células aderidas, após infecção fágica (PFU/ml = $2 \times 10^9$ ) .....	99
Figura 5.11 - Restos celulares de <i>P. fluorescens</i> numa superfície de vidro (1 – bactérias; 2 – restos celulares) .....	100
Figura 5.12 - Imagens SEM (ampliação 10000×) da superfície colonizada com células de <i>P. fluorescens</i> antes (A) e após (B) a infecção fágica .....	101
Figura 5.13 - Espectros EDS e imagens SEM (ampliação 10000×) de diferentes superfícies: superfície de vidro (A), vidro revestido com fago (B), vidro revestido com <i>P. fluorescens</i> (C) e vidro após infecção fágica de <i>P. fluorescens</i> aderidas (D) .....	102
Figura 5.14 - Imagens de microscopia de epifluorescência com (A) SYBR Green I e (B) DAPI .....	104
Figura 5.15 - Número de células aderidas durante os ensaios de recolonização .....	105

## *Índice de Tabelas*

Tabela 1.1 - Algumas propriedades dos fagos utilizadas na taxonomia (ICTV) .....	4
Tabela 1.2 - Etapas de um processo de replicação fágico .....	5
Tabela 1.3 - Receptores de alguns bacteriófagos de <i>E. coli</i> .....	6
Tabela 2.1 - Número de PFUs obtidos antes e após a ação da DNase I .....	43
Tabela 3.1 - Volumes utilizados na preparação de 2 géis de poliacrilamida de 12% .....	51
Tabela 3.2 - Parâmetros de infecção fágicos obtidos para culturas celulares crescidas e infectadas a 4°C, 26°C e a 37°C .....	56
Tabela 3.3 - Parâmetros de infecção fágicos obtidos para culturas celulares crescidas a 26°C e infectadas a T <sub>1</sub> .....	57
Tabela 3.4 - Parâmetros obtidos após infecção fágica a 26°C de culturas de <i>P. fluorescens</i> crescidas a 4°C, 26°C e 37°C e respectivas taxas específicas ( $\mu$ ) .....	59
Tabela 3.5 - Parâmetros obtidos após infecção fágica a 26°C de culturas de <i>P. fluorescens</i> na fase exponencial, estacionária e de declínio .....	61
Tabela 3.6 - Parâmetros obtidos após infecção fágica de culturas de <i>P. fluorescens</i> crescidas em meio MCN e MG .....	63
Tabela 4.1 - Parâmetros de infecção obtidos após infecção fágica de biofilmes de <i>P. fluorescens</i> a diferentes temperaturas (T <sub>1</sub> ) .....	80
Tabela 4.2 - Parâmetros de infecção obtidos após infecção fágica a 26°C de biofilmes de <i>P. fluorescens</i> formados a diferentes temperaturas (T <sub>c</sub> ) .....	81
Tabela 4.3 - Redução de biomassa após infecção fágica durante 200 minutos de biofilmes e culturas de <i>P. fluorescens</i> crescidas a 26°C .....	82
Tabela 5.1 - Efeito do título do fago inicial na taxa de remoção de células por cm <sup>2</sup> e na percentagem de células removidas .....	100
Tabela 5.2 - Composição química das amostras analisadas por EDS .....	103

## ***Lista de Siglas***

ADN	<i>Ácido Desoxirribonucleico</i>
ARN	<i>Ácido Ribonucleico</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	<i>Adenosina Tri-fosfato</i>
BCA	<i>Bicinchoninic Acid</i>
CF	<i>Citometria de Fluxo</i>
CLSM	<i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i>
CTAB	<i>Cetyltrimetyl Ammonium Bromide</i>
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride</i>
DIC	<i>Differential Interface Contrast</i>
D.O.	<i>Densidade Óptica</i>
EDS	<i>Energy Dispersive Spectrometer</i>
EPS	<i>Extracellular Polymeric Substances</i>
ICTV	<i>International Committee on the Taxonomy of viruses</i>
k	<i>Taxa de Lise Celular</i>
L	<i>Período de Latência</i>
MCN	<i>Meio de Caldo Nutritivo</i>
ME	<i>Microscopia Electrónica</i>
MEP	<i>Microscopia de Epifluorescência</i>
MG	<i>Meio de Glucose</i>
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
MPF	<i>Meio de Preservação de Fago</i>
MSCN	<i>Meio Sólido de Caldo Nutritivo</i>
MTA	<i>Meio Top Agar</i>
PEG	<i>Polietileno Glicol</i>
PFU	<i>Plaque Forming Units</i>

PFU/t	<i>Taxa de Libertação de Fagos</i>
PME	<i>Proteínas da Membrana Externa</i>
PSA	<i>Persulfato de Amónia</i>
RLU	<i>Relative Light Units</i>
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
$\mu$	<i>Taxa Específica de Crescimento</i>

# Capítulo 1 - Introdução Geral

## 1.1. BACTERIÓFAGOS

### 1.1.1 Descoberta dos Bacteriófagos

A história da descoberta dos bacteriófagos ou fagos tem sido controversa e sujeita a vários debates. Ernest Hanking, um bacteriologista britânico, relatou em 1896 a existência de elevada actividade antibacteriana (contra *Vibrio cholerae*) observada em águas de dois rios na Índia, o Ganges e o Jumna. Hanking sugeriu que uma substância não identificada seria responsável por este fenómeno limitando a expansão das epidemias de cólera. Em 1898 o bacteriologista russo Gamaleyá observou um fenómeno similar enquanto trabalhava com *Bacillus subtilis*. Observações idênticas foram efectuadas por vários outros investigadores e pensa-se, actualmente, que estariam todas relacionadas com o fenómeno fágico. Estes investigadores não exploraram as suas descobertas e foi quase 20 anos mais tarde que se voltou a reintroduzir o assunto através das pesquisas de Frederick W. Twort, um bacteriologista de Inglaterra e superintendente do Instituto Brown de Londres (Sulakvelidze *et al*, 2001). Twort encontrava-se a pesquisar vírus que pudessem crescer em meios laboratoriais artificiais. Para testar esta hipótese, Twort inoculou uma placa de agar nutritivo com o vírus da varicela na esperança de encontrar um modo de replicação deste agente sem ter de recorrer a animais. Embora esta experiência não tido um sucesso, na placa de agar cresceram rapidamente alguns contaminantes bacterianos. Twort notou que algumas colónias bacterianas tinham sofrido uma mudança visível e apresentavam agora um aspecto aquoso, ou seja, mais transparente. Notou também que essas colónias tinham

perdido a capacidade de se replicar e por esse motivo lisavam. Twort decidiu chamar a este fenómeno de transformação transparente e começou a demonstrar que infectando células em bom estado com solução transparente as bactérias lisavam. Esta solução podia ser diluída mil vezes no entanto, sempre que colocada em soluções com bactérias “recuperava a sua força”. O agente podia ser guardado durante 6 meses, mas quando aquecido perdia a actividade. Twort publicou um pequeno artigo sobre este tema em 1915 sugerindo que a explicação para a sua experiência era a descoberta de um vírus capaz de lisar células (Levine, 1939). Twort não continuou com as suas investigações e só 2 anos mais tarde é que os fagos foram “oficialmente” descobertos por Félix d’Hérelle, um microbiologista do Instituto Pasteur de Paris.

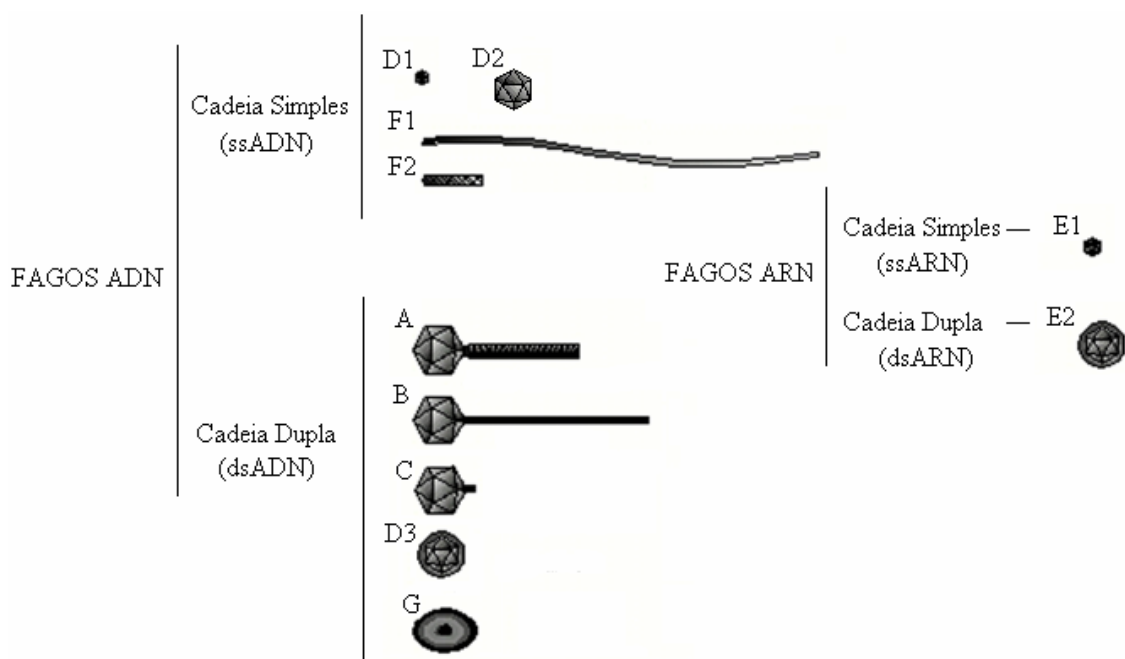
A descoberta ou redescoberta dos fagos por d’Hérelle é frequentemente associada a um grave surto de desintéria hemorrágica entre as tropas francesas estacionadas nos limites da cidade de Paris, em Maisons-Laffitte, em Julho-Agosto de 1915. Aparentemente, em 1910, d’Hérelle já tinha observado um fenómeno idêntico quando estudava meios microbiológicos para controlar uma praga de gafanhotos no México (Sulakvelidze *et al*, 2001). Entre as tropas francesas a doença era causada por um *Bacillus* que d’Hérelle detectou em emulsões de fezes provenientes de pessoas doentes. D’Hérelle espalhou esta bactéria em placas de petri contendo agar para permitir a sua replicação e o seu isolamento. D’Hérelle reparou que enquanto as bactérias cresciam e cobriam a superfície da placa de petri, por vezes apareciam pequenas manchas circulares onde não havia crescimento. Ele denominou estas pequenas manchas por *taches vierges* (placas) e iniciou o isolamento da bactéria e das placas de apenas um paciente. Para isso retirou amostras do paciente em cada dia de infecção, cultivou a bactéria e procurou encontrar placas, de modo a tentar relacionar as mudanças na doença com as mudanças nas placas. Durante 3 dias obteve, em todos os frascos de cultura, apenas crescimento bacteriano e nenhum sinal de placas. No entanto, no quarto dia, algumas horas após a colocação de gotas de amostra numa cultura de *Bacillus* de desintéria, a cultura tinha ficado perfeitamente límpida. Verificou também que o paciente estava a recuperar (Levine, 1939). D’Hérelle denominou este grupo de vírus - de bacteriófagos, nome que sugere que “estes vírus comem as bactérias” (Sulakvelidze *et al*, 2001). Em 1917, d’Hérelle publicou estas observações, descrevendo

os procedimentos gerais de isolamento de vírus bacterianos, com ensaios avaliando as placas formadas numa superfície com células. D'Hérelle continuou os seus ensaios e em pouco tempo isolou fagos de outras bactérias causadoras de doenças (ex.: cólera, antrax, difteria, praga bubónica, etc.), desenvolvendo, também, o método principal para quantificação de vírus e outras teorias, nomeadamente o do ciclo de replicação dos fagos (Levine, 1939).

Esperava-se que a capacidade dos fagos para lisar bactérias pudesse ser usada para prevenir e tratar doenças bacterianas. Apesar de alguns trabalhos indicarem que os fagos têm um efeito positivo numa variedade de doenças, a descoberta dos antibióticos originou a paragem da investigação nesta área. No entanto, os estudos das propriedades genéticas dos fagos levaram ao desenvolvimento de uma nova área nas ciências biológicas – a biologia molecular – que permitiu grandes avanços tanto nas ciências biológicas como médicas.

### 1.1.2 Classificação de Fagos

A classificação utilizada actualmente foi descrita por Ackerman *et al.* em 1992.



**Figura 1.1** – Classificação dos fagos com base na morfologia e no tipo de ácido nucleico (Ackerman *et al.*, 1992).



Os fagos encontram-se divididos em 6 grupos consoante o tipo morfológico, tipo de ácido nucleico e hospedeiro. Os fagos podem ser tanto de ADN (cadeia simples (ss) ou de cadeia dupla (ds)) ou de ARN (cadeia simples (ss) ou de cadeia dupla (ds)).

Os fagos de ADN de cadeia dupla podem ser: fagos com cauda contráctil (A), com cauda não-contráctil (B), com cauda curta (C), fagos sem cauda (D3) e fagos pleomórficos protegidos por um invólucro lipídico (G). Os fagos de ADN de cadeia simples são bastante diferentes podendo ser icosaédricos (D1 e D2) ou filamentosos (F1 e F2).

Os fagos do grupo E são icosaédricos com ARN de cadeia simples (E1) ou dupla (E2).

Cerca de 96% dos fagos estudados possui cauda e estão divididos em três famílias distintas, tendo em conta as características morfológicas destas. Cerca de 60% dos fagos com cauda longa e não contráctil pertencem aos *Siphoviridae*, 25% dos fagos com cauda contráctil são *Myoviridae* e os de cauda curta e não contráctil são *Podoviridae*.

O sistema de classificação taxonómico é regularmente actualizado e aprovado pelo Comité Internacional da Taxonomia de Vírus (ICTV<sup>1</sup>). De acordo com o ICTV os fagos são classificados com base nas propriedades indicadas na Tabela 1.1.

**Tabela 1.1** – Algumas propriedades dos fagos utilizadas na taxonomia (ICTV).

<b>Morfologia</b>	Tamanho, forma, presença ou ausência de envelope, simetria do capsídeo, estrutura
<b>Propriedades físico-químicas e físicas</b>	Massa molecular, coeficiente de sedimentação, estabilidade (com o pH, temperatura, catiões, solventes, detergentes, etc.) Tamanho do genoma (kb/kbp), ácido nucleico (simples ou cadeia dupla), genoma linear ou circular, número e tamanho de segmentos, etc.
<b>Proteínas</b>	Número, tamanho, actividade funcional das proteínas estruturais e não-estruturais. Detalhes de proteínas com actividade funcional especial.
<b>Lípidos</b>	Conteúdo, características, etc.
<b>Propriedades biológicas</b>	Hospedeiro, modo de transmissão no ambiente, distribuição geográfica, patogenicidade, etc.

<sup>1</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV/>

### 1.1.3 Etapas do Ciclo de Replicação de Fagos

Os fagos não têm metabolismo próprio e, por esse motivo, necessitam do metabolismo, dos recursos energéticos e dos recursos materiais dos seus hospedeiros para se replicarem. Vários passos de um processo de replicação de fagos são comuns a todos os vírus (Duckworth, 1987). Na Tabela 1.2 estão resumidas as várias etapas de um processo de replicação fágico.

**Tabela 1.2** – Etapas de um processo de replicação fágico.

1. Adsorção
2. Separação do ácido nucleico da proteína
3. Expressão e replicação do ácido nucleico
a. mRNA pré-inicial e síntese proteica
b. mRNA inicial e síntese proteica
c. replicação do ácido nucleico
d. mRNA final e síntese proteica
4. Formação de novas partículas fágicas
5. Libertação de novos fagos

#### **Etapa 1** - Interação fago-hospedeiro ou adsorção

O primeiro estágio da infecção, designado por adsorção, é bastante complexo, sendo constituído por três fases: o contacto inicial, a ligação reversível e a ligação irreversível. Tal como todos os vírus, os fagos ligam-se a receptores específicos existentes na superfície dos hospedeiros para iniciar a replicação (Levine, 1939).

O **contacto inicial** do fago com as células é conseguido através de efeitos de difusão e movimentos Brownianos.

Segue-se uma **ligação reversível** (ligação fraca) que pode incluir a associação de qualquer estrutura fágica à superfície celular, existindo forças electrostáticas a actuar para implementar a adesão não específica. Esta associação não específica é seguida por uma interação reversível específica com uma estrutura na superfície celular. Esta estrutura pode ser ou não o receptor para a ligação irreversível.

Na última fase da adsorção ocorre a **ligação irreversível** (ligação forte) entre o fago e os receptores. O número e tipo de receptores da superfície bacteriana varia bastante e por vezes as moléculas reconhecidas pelo fago são componentes essenciais da superfície celular (Goyal *et al.*, 1987). A superfície externa de células procarióticas apresenta um conjunto de particularidades que inclui material estrutural (glicoproteínas e lipopolissacáridos), maquinaria de transporte (aminoácidos ou complexos transportadores de açúcares) e aparelhos de interacção entre células (o *F pilus*). A adesão de fagos às células hospedeiras pode empregar qualquer uma destas estruturas, dependendo do fago (Wagner e Hewlett, 1999).

Na tabela 1.3 encontram-se alguns dos receptores para determinados fagos de *Escherichia coli*.

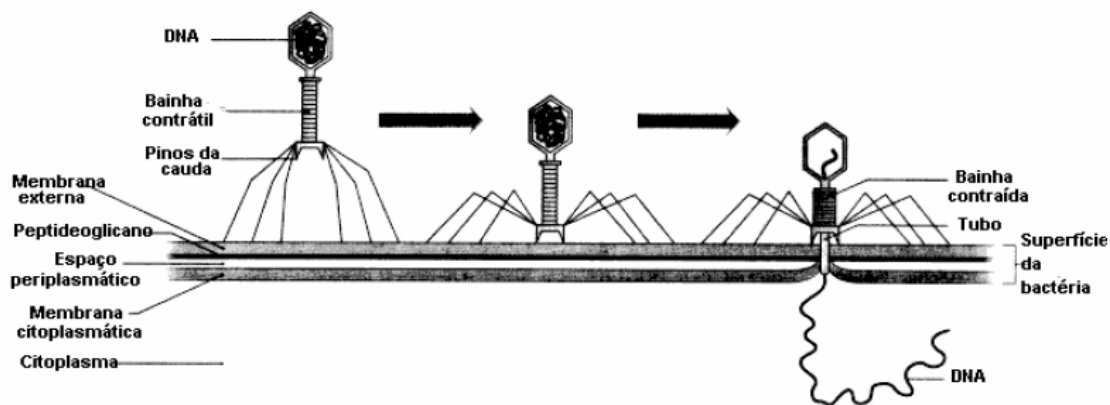
**Tabela 1.3** – Receptores de alguns bacteriófagos de *E. coli*.

Vírus	Estrutura	Função normal
T2	Proteína da Membrana Externa F	Porina proteica
	Lipopolissacáridos	Estrutura da membrana externa
T4	Proteína da Membrana Externa C	Porina proteica
	Lipopolissacáridos	Estrutura da membrana externa
T6	Tsx	Proteína transportadora de nucleósidos
T1 e T5	TonA	Transporte de ferricromo
$\lambda$	LamB	Proteína transportadora de maltose
MS2	F pilus	Conjugação

Virtualmente, qualquer componente existente na superfície é usado por algum fago como sítio específico de adesão, nem que tenha de haver, em certos casos, um rearranjo físico da partícula fágica.

No caso específico da interacção do fago T4 com a superfície de células de *E. coli*, a ligação ocorre em duas etapas. Primeiro, há uma interacção relativamente fraca, entre as pontas das fibras e os resíduos lipopolissacáridos existentes na superfície da membrana externa da célula. Esta interacção despoleta uma segunda interacção mais forte e irreversível. Neste passo, os pinos da cauda interactuam com estruturas

existentes na membrana externa da célula requerendo uma alteração na conformação das fibras da cauda. Posteriormente ocorre a compressão da cauda contráctil e injeção do ADN fágico para o interior da célula hospedeira através da penetração da parede celular pelo tubo da cauda do fago (Figura 1.2). O ADN fágico tem ainda de atravessar a membrana interna da célula com a ajuda de um produto viral denominado por proteína piloto (Wagner e Hewlett, 1999).



**Figura 1.2** – Adsorção do fago a uma célula hospedeira e consequente penetração por injeção do ácido nucleico (Pelczar *et al.*, 1993).

A quantidade actual de fago que entra na célula hospedeira é variável. No caso de fagos com cauda, apenas o ADN fágico e certas proteínas acessórias entram na célula. Em fagos sem cauda (ex.: MS2) a partícula fágica entra inteiramente na célula passando para o citoplasma.

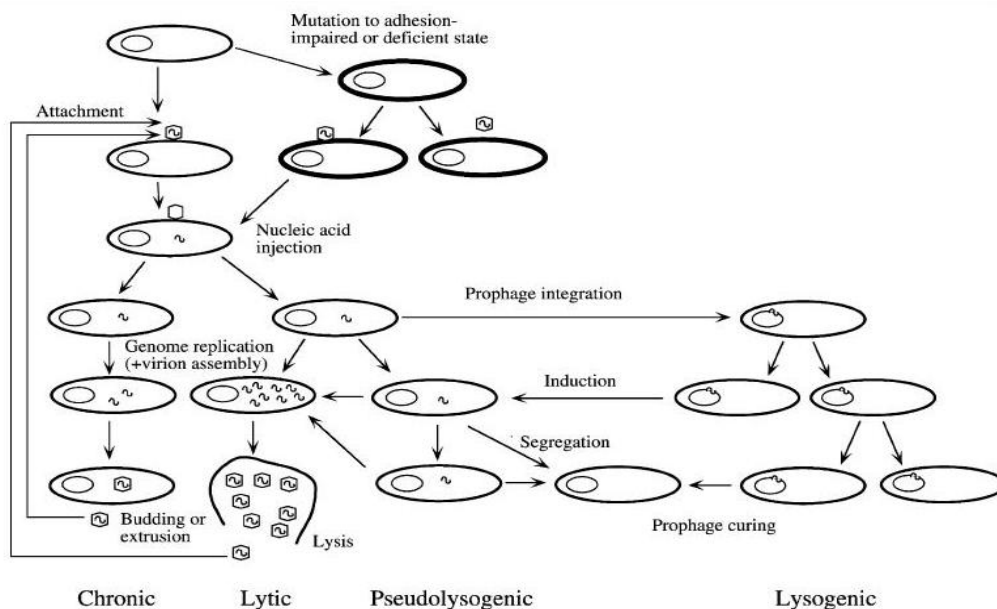
### **Etapa 2 - Separação do ácido nucleico da proteína**

Após a ligação irreversível do fago à superfície da célula parte ou todo o virião entra na célula resultando na libertação do material genómico do fago no seu interior. Durante a transformação bacteriana, a membrana celular é modificada, de forma a tornar a célula competente para a entrada do ADN fágico, através da introdução de novas proteínas na membrana celular (Zoon *et al.*, 1976). A parede celular da célula torna-se penetrável podendo a penetração dos vírus nas células ocorrer de quatro modos distintos: injeção do ácido nucleico, endocitose, fusão do envelope fágico e translocação.

Os fagos que penetram por endocitose, após a sua ligação ao receptor, são englobados pela membrana plasmática, ficando no interior de vesículas nas células. Estas vesículas podem fundir com endossomas para posterior digestão da cápside viral libertando, desse modo, o ácido nucleico. Os fagos com envelope adoptam o método de fusão no qual ocorre uma fusão entre o envelope e a membrana celular, libertando-se o capsídeo nucleotico dentro da célula.

### Etapa 3 - Expressão e replicação do ácido nucleico

Após a entrada do ácido nucleico fágico numa bactéria existem várias respostas possíveis (Figura 1.3).



**Figura 1.3** – Tipos de ciclos fágicos. O modelo foi adaptado de Weinbauer (2003).

No caso de fagos com **resposta lítica** (causada por fagos virulentos) o fago redirecciona o metabolismo do hospedeiro para a produção de novos fagos que são libertados através da lise da célula.

A **resposta lisogénica** de fagos resulta na criação de ADN fágico a partir do cromossoma do hospedeiro. Nestes casos, o fago replica-se sem causar a lise das células (Kornberg, 1980; Luria *et al.*, 1978; Stent e Calendar, 1978) ou seja, o fago permanece num estado dormente (profago) e replica juntamente com o hospedeiro.

A *resposta pseudolisogénica* ou *infecção persistente* de fagos resulta na multiplicação de apenas uma fracção da população. Neste tipo de resposta a taxa de infecção é reduzida devido a uma disponibilidade limitada de receptores, perda enzimática de receptores ou imunidade de fagos temperados à superinfecção. Este facto permite a presença simultânea de fagos e bactérias numa cultura (Barksdale e Arden, 1974).

A resposta do tipo *infecção crónica* ocorre quando uma célula é infectada e o *progeny* do fago é constantemente libertado da célula hospedeira por exclusão sem ocorrer a lise da célula.

É comum agruparem-se os fagos em virulentos (resposta lítica) e em fagos temperados (resposta lisogénica). Nos fagos temperados as células infectadas permanecem vivas enquanto o fago se encontra na fase de latência. O estado de latência ocorre como resultado da síntese de um repressor proteico pouco após a entrada do ADN fágico na célula. Este repressor adere a certos locais do ADN fágico e previne a replicação normal do ADN da célula. Por outro lado, se a célula for sujeita a algum stress, o repressor pode ser inactivado o que iniciará a resposta lítica. Sendo assim, um fago temperado pode iniciar tanto uma resposta lítica como lisogénica (Hershey, 1971; Kornberg A, 1980, Luria *et al.*, 1978; Stent e Calendar, 1978). Os fagos filamentosos não são classificáveis em virulentos ou temperados. Estes fagos aderem ao *pili* de F<sup>+</sup> e as células infectadas continuam a crescer e a produzir novos fagos que são segregados através da parede celular sem que ocorra lise celular (Denhart, 1975).

#### **Etapa 4 - Formação de novas partículas fágicas**

Os processos bioquímicos que ocorrem em células infectadas são controlados e têm uma progressão ordenada. As fases do processo são geralmente referidas como pré-iniciais, iniciais e tardias ou finais.

Nas reacções da *fase pré-inicial* o fago apodera-se da maquinaria de síntese proteica da célula hospedeira e prepara a célula para a produção de macromoléculas. Outras funções pré-iniciais asseguram que apenas o ácido nucleico do fago é replicado e que nenhum outro fago estranho interfira no processo. Um dos aspectos da replicação fágica mais fascinantes e menos compreendida é o facto de uma pequena porção de

ácido nucleico, após a entrada na célula, consegue ser responsável pela subversão completa de toda a capacidade sintética da célula para a conversão de novos fagos.

Na *fase inicial* ocorre a síntese de enzimas e substratos necessários para a posterior replicação do ácido nucleico.

Na *fase final* ou tardia são sintetizadas proteínas estruturais virais e enzimas necessárias para a morfogénese da cápsula e, também, para o empacotamento do ácido nucleico.

A progressão ordenada das reacções durante a infecção fágica resulta da expressão sequencial do fago.

Depois da síntese das proteínas e do ácido nucleico é necessário que ocorra a junção dos dois para se formarem partículas virais maduras.

#### **Etapa 5 - Lise celular**

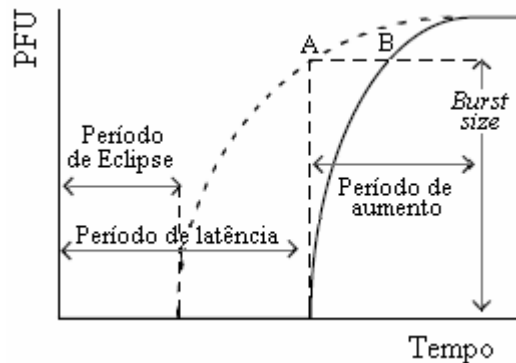
A lise celular liberta as partículas virais e outros componentes celulares para o meio extracelular e é a etapa final de um processo lítico de infecção. Este processo é realizado através de um sistema de lise dupla em que:

- a) o peptidoglicano tem de ser hidrolisado através de endolisinas que atacam a porção de mureína da parede celular;
- b) a membrana citoplasmática tem de ser destruída pelas holinas (Goyal *et al.*, 1987; Ackermann, 1999).

Uma lise celular natural pode ter consequências letais para os vírus. Quando ocorre lise prematura o fago pode ainda não estar completamente formado e, por conseguinte, pode dar-se a perda de espécies fágicas (Levine, 1939).

Para um grupo específico de fagos, os fagos com cauda, a morfogénese é tão idêntica que foi sugerida um processo padrão (Ackermann, 1999). A produção de uma descendência fágica em função do tempo pode ser descrita por uma curva de *one-step-growth*. Este método consiste na mistura de bactérias e fagos. A adsorção é permitida durante alguns minutos e os fagos não adsorvidos são removidos por centrifugação ou adição de soro “antifago”. As bactérias são reinoculadas num grande volume de meio, a partir do qual são retiradas duas amostras em simultâneo e ao longo do tempo. Uma das

amostras é tratada com clorofórmio, levando à ruptura das bactérias para enumeração das partículas fágicas totais (linha A, Figura 1.3) e a outra amostra é utilizada para permitir o cálculo do título de fagos libertados (linha B, Figura 1.3).



**Figura 1.4** – Representação gráfica de uma curva de *one-step-growth* para um fago lítico como o fago T4.

A fase do período de latência antes da formação dos fagos maduros é designado por *período de eclipse*, ou seja, este período termina com a formação de, pelo menos, uma partícula fágica madura (Ferreira e Sousa, 2002). O *período de latência* caracteriza-se pela acumulação intracelular de fagos à qual se segue a libertação para o meio extracelular dos primeiros fagos delimitando-se, assim, este período. O *período de aumento* é caracterizado pela libertação exponencial de fagos maduros no ambiente extracelular devido à lise celular e pela detecção de fagos livres, atingindo-se um valor máximo no final do ciclo. Pode-se, calcular, para cada sistema fago/hospedeiro, o número médio de fagos libertados por célula infectada designado vulgarmente por *burst size* (Ackermann, 1999).

#### 1.1.4 Estratégia de Sobrevivência dos Fagos

Para garantir a sobrevivência do fago é fundamental que não ocorra a lise total das células hospedeiras, uma vez que sem a presença de células hospedeiras o fago não consegue sobreviver por muito tempo. Alguns fagos desenvolveram estratégias alternativas para os normais ciclos virais de multiplicação – os ciclos “*live-and-let-live*”



e outros mutaram alterando as proteínas da cápsula o que lhes permite a ligação a novos receptores.

Os fagos que sofreram mutação desenvolveram, através da alteração da gama de hospedeiros, a capacidade de entrar em ambientes completamente novos (Levine, 1939).

Tanto os fagos temperados como os virulentos têm a capacidade de inibir os fagos infecciosos, homólogos ou heterólogos, resultando no que se denomina de exclusão mútua entre fagos relacionados e não relacionados. Estas interações entre elementos extracromossomais bacterianos, mais do que qualquer outro factor, ditam se uma bactéria será infectada por um determinado fago. Os mecanismos usados pelos elementos extracromossomais (plasmídeos ou fagos) para prevenir a infecção dos hospedeiros pelos fagos inclui a indução da imunidade, a alteração da superfície celular para produzir resistência (impossibilitando a adsorção do fago), exclusão de ADN superinfectante, restrição endonucleótida do ADN e infecção abortativa ou interferência no crescimento (Duckworth *et al.*, 1981).

### **1.1.5 Mutação dos Hospedeiros**

Ocasionalmente ocorrem mutações das bactérias hospedeiras que impossibilitam a síntese dos receptores da parede necessários à adsorção do fago. As células mutantes adquirem, desta forma, resistência ao fago. As populações de células resistentes sobrevivem à infecção fágica e continuam a replicar-se podendo, eventualmente, sobrepor-se como o tipo dominante da população (Levine, 1939).

### **1.1.6 Ecologia dos Fagos**

A ecologia fágica é o estudo das interações do fago com os ambientes biótico e abiótico. Este estudo é extremamente importante para compreender como é que os fagos interactivam entre si e com outros elementos extracromossomais. A ecologia fágica pode ser diferenciada em 4 categorias gerais:

(i) *ecologia fágica dos organismos* – que é o estudo das adaptações que o fago emprega para aumentar a probabilidade da sua transmissão entre hospedeiros (ex.:

habilidade para reparar, durante a infecção, os estragos provocados no ácido nucleico devido à luz ultravioleta);

(ii) *ecologia fágica da população* – é o estudo das características da “vida” fágica. Aplica-se para compreender o crescimento fágico e a competição intra específica;

(iii) *ecologia fágica da comunidade* – foca a estabilidade dos ambientes contendo fagos (ex.: capacidade dos fagos para levar à extinção de bactérias sensíveis ao fago). Os estudos realizados são difíceis devido à co-evolução das bactérias com os seus fagos predadores;

(iv) *ecologia fágica do ecossistema* – considera o impacto dos fagos no fluxo de energia e no ciclo de nutrientes dentro de um ecossistema (ex.: os fagos conseguem destruir bactérias existentes no solo responsáveis pelo ciclo do nitrogénio) (Gill e Abedon, 2003).

### 1.1.7 Terapia fágica

Antes do aparecimento e da larga expansão dos antibióticos foi sugerido que as infecções bacterianas poderiam ser prevenidas e/ou tratadas com a administração de fagos. Realizaram-se, nos inícios do século 20, vários estudos tanto com humanos como com animais e chegaram mesmo a ser produzidas, em 1940 pela companhia Eli Lilly (Indianapolis, Ind.), 7 preparações fágicas para diferentes doenças causadas por exemplo por *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia* e outras bactérias patogénicas.

Hoje em dia os fagos são considerados agentes terapêuticos potencialmente atraentes devido às diversas características que possuem, nomeadamente: (i) são extremamente específicos e muito eficazes na lise de bactérias patogénicas, (ii) não são patogénicos para o homem e animais e (iii) são rapidamente modificáveis para combater o aparecimento de novas ameaças bacterianas. Para além destas características os fagos apenas se replicam nos locais aonde se encontra a infecção. As bactérias que adquirem resistência a fagos são susceptíveis a outros fagos com hospedeiros similares. Os fagos líticos podem, portanto, ser agentes terapêuticos eficientes em alguns ambientes clínicos seleccionados (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

Os fagos têm sido igualmente propostos para agentes controladores de patogénicos nas plantas de forma a reduzir o uso de agentes químicos (Okabe e Goto, 1963; Leverentz *et al.*, 2001; McKenna *et al.*, 2001).

O interesse na terapia fágica está de novo a aumentar devido ao aparecimento de bactérias patogénicas resistentes à maioria, se não a todos, dos agentes antimicrobianos disponíveis no mercado.

## 1.2. BACTÉRIAS

### 1.2.1 Bactérias Formadoras de Biofilmes

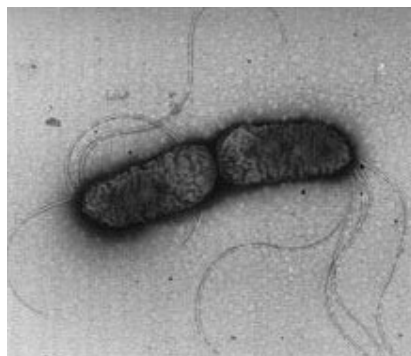
Os microrganismos que participam em processos de adesão e posterior formação de biofilmes são causadoras de graves prejuízos em diferentes superfícies de ambientes do foro alimentar, doméstico e áreas institucionais (Lappin-Scott e Bass, 2001). Na indústria alimentar os biofilmes constituem um risco higiénico e causam perdas económicas devido a falhas técnicas nos sistemas de águas, torres de arrefecimento, permutadores de calor, etc. Na medicina, os biofilmes contribuem para o aumento de riscos de infecção devido ao seu crescimento em implantes, catéteres e outros dispositivos médicos (Meyer, 2003).

Existe, hoje em dia, uma procura notável para identificar os organismos patogénicos em termos de adesão a superfícies. Salienta-se a pesquisa efectuada em diferentes géneros tais como: *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Listeria*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Mycobacteria*.

#### **A família das *Pseudomonadaceae* e o género *Pseudomonas***

Os géneros mais importantes da família das *Pseudomonadaceae* são os géneros *Pseudomonas*, *Xantomonas* (patogénica de plantas), *Frateuria* e *Zooglea* (organismo dominante nas lamas activadas). Para uma bactéria ser incluída na família das *Pseudomonas* é necessário ter as seguintes características: ter forma de bastonetes direitos ou ligeiramente curvos (0.5-1.0µm de diâmetro por 1.5-5.0µm de largura) (Figura 1.5); ser Gram negativas; aeróbias; não formadoras de endósporos;

quimiorganoheterotróficas e, principalmente, ter um modo de inserção polar dos flagelos. Os flagelos polares conferem mobilidade às bactérias e raramente se encontram *Pseudomonas* que não apresentam mobilidade, embora em certos casos a inserção flagelar seja do tipo subpolar.



**Figura 1.5** – Bactéria da família das *Pseudomonadaceae*.

O metabolismo das *Pseudomonas* é tipicamente do tipo respiratório sendo o oxigénio o aceitador final de electrões. No entanto, em alguns casos, o nitrato pode ser usado como aceitador de electrões alternativo permitindo que nesses casos o crescimento ocorra em condições de anaerobiose (Krieg e Holt, 1984). Todas as espécies de *Pseudomonas* estudadas apresentam o ciclo de Krebs funcional e para fins biossintéticos, o ciclo do glioxilato encontra-se operativo como um sistema anaplerótico. O catabolismo da glucose e outros monossacáridos pela via de Entner-Doudoroff ocorre em muitas espécies substituindo a via glicolítica. As *Pseudomonas* fluorescentes oxidam a glucose pela via do 6-fosfogluconato. O sistema do fosfoenolpiruvato-fosfotransferase encontra-se operativo para o metabolismo de frutose em várias espécies de *Pseudomonas*.

Algumas das espécies de *Pseudomonas* são pigmentadas sendo os pigmentos solúveis mais notórios a pioverdina e a piocianina. A estrutura da piocianina é bem conhecida e tem uma cor azul enquanto que a estrutura da pioverdina apenas está parcialmente caracterizada. As pioverdinas são bastante instáveis sendo os componentes principais um cromóforo quinolino associado a um peptídeo cíclico cuja composição varia conforme a espécie (Krieg e Holt, 1984).

Os membros do género *Pseudomonas* têm exigências nutricionais muito simples e crescem quimi-organo-heterotroficamente a pH neutro. Algumas espécies conseguem utilizar mais de 100 compostos orgânicos como fonte de carbono e energia e só um número muito limitado utiliza um número de compostos inferior a 20 (Ferreira e Sousa, 2000).

Crescem a temperaturas na gama mesofílica sendo, no entanto, a temperatura óptima de crescimento, da maior parte das estirpes, aproximadamente 28°C (Krieg e Holt, 1984).

As *Pseudomonas* encontram-se largamente dispersas no ambiente e algumas espécies são patogénicas para os humanos, animais e plantas (Krieg e Holt, 1984). Desempenham um papel ímpar no ciclo do carbono na natureza através da mineralização completa de vários compostos orgânicos. Estão também envolvidas na degradação de químicos produzidos e introduzidos no ambiente pelo Homem. As *Pseudomonas* são, em geral, incapazes de hidrolisar compostos poliméricos nos seus monómeros constituintes e, por esse motivo, só actuam após a despolimerização ter sido levada a cabo por outros microrganismos (Ferreira e Sousa, 2000).

A *Pseudomonas fluorescens* está envolvida na alteração de alimentos refrigerados pois consegue crescer a 4°C e hidrolisar lípidos e proteínas. Como exemplos de alterações ocorridas em alimentos referem-se as alterações de cor, sabor e aroma do leite e derivados. As *P. fluorescens* podem mesmo contaminar o sangue e derivados sob refrigeração. Contudo, como se multiplica com dificuldade a 37°C, raramente é patogénica.

### **1.2.2 Teorias de Formação de Biofilmes**

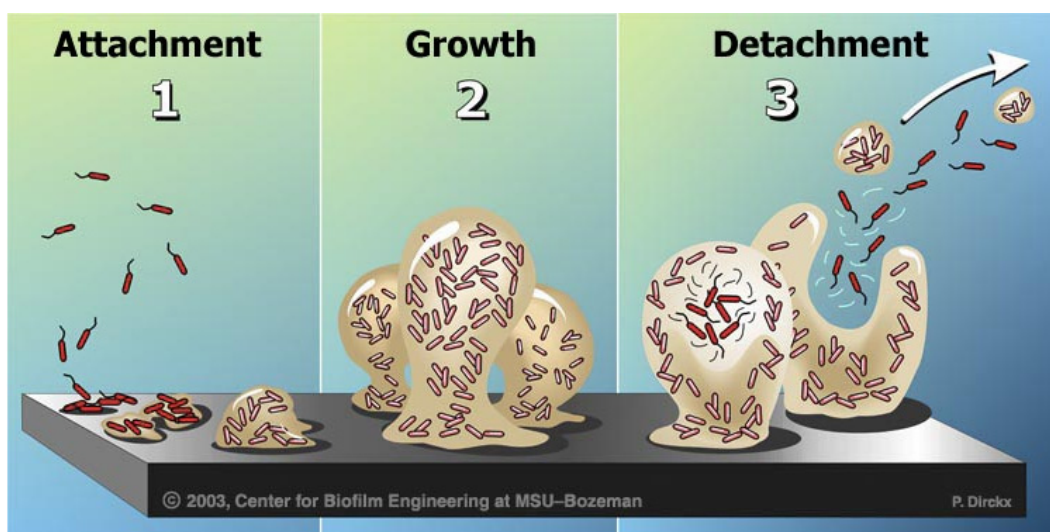
Os biofilmes podem ser encontrados numa vasta gama de superfícies bióticas e abióticas e podem ser constituídos por uma população que se desenvolveu de uma única espécie ou por uma comunidade resultante de múltiplas espécies (Davey e O'Toole, 2000). A teoria de formação dos biofilmes tem evoluído ao longo de vários anos de pesquisa. Uma das primeiras teorias foi descrita em 1971 por Marshall *et al.* sugerindo que o processo de adesão ocorreria em apenas duas etapas. Na primeira fase, o processo

é ainda reversível e a adesão de microrganismos às superfícies ocorre devido às forças de Van der Waals e à atracção electrostática. Na segunda etapa do processo ocorre uma interacção da célula com a superfície por meio de material extracelular produzido pela bactéria. Este material irá suportar a formação do biofilme.

Poucos anos depois, surgiu uma outra teoria sugerindo que a comunidade de células aderidas, em sistemas aquáticos, encontrava-se envolvida numa matriz que revelou ser constituída de polissacáridos e que funcionava como mediador da adesão das células às diferentes superfícies (Costerton *et al.*, 1978). Em meados dos anos 80 a teoria de formação de biofilmes foi significativamente alterada e foi sugerido um processo que ocorreria em 5 fases: (i) condicionamento da superfície pela adsorção de material orgânico, (ii) transporte de células e nutrientes para o local de adesão, (iii) início do processo de adesão bacteriana, ainda reversível, devido a atracção electrostática, (iv) crescimento celular, colonização e adesão irreversível e (v) o biofilme desenvolve-se e apresenta uma elevada actividade metabólica (Duddridge e Pritchard, 1983, Characklis e Cooksey, 1983, Characklis, 1984).

Em 1991, Notermans *et al.* propôs a teoria pela qual a formação de biofilmes seria conseguida em 3 fases: (i) fixação da bactéria, (ii) consolidação da bactéria na superfície e (iii) colonização e crescimento da bactéria. Na segunda etapa desta teoria ocorre a produção de material extracelular que facilita a fixação dos microrganismos e impossibilita a remoção das bactérias aderidas.

Recentemente foi sugerida uma teoria, também decorrente em 3 fases, para a formação de biofilmes (Figura 1.6). Numa primeira fase ocorre a adesão de microrganismos à superfície seguida do crescimento celular, formando-se uma estrutura complexa. Após a adesão e maturação do biofilme há libertação de células para o fluido (Costerton e Stewart, 2001; Sauer *et al.*, 2002).



**Figura 1.6** – Esquema representativo da formação de biofilmes (*Center for Biofilm Engineering, 2003*<sup>2</sup>).

### 1.2.3 Composição dos Biofilmes

Existem várias definições de biofilme mas, no geral, os biofilmes podem ser vistos como aglomerados de células microbianas e dos seus produtos excretados aderidos a superfícies inertes (Sutherland *et al.*, 2004).

A composição dos biofilmes depende de vários factores, nomeadamente: do tipo de microrganismo, do seu estado fisiológico, ambiente físico (incluindo condições laminares ou turbulentos) e da superfície na qual as células estão aderidas. As várias fases da interacção microbiana com a superfície parecem requerer a produção de estruturas extracelulares microbianas que ajudam na adesão inicial, na manutenção da estrutura do biofilme e mesmo no desprendimento de agregados (Sauer *et al.*, 2002). Os biofilmes consistem, assim, de estruturas dinâmicas dentro das quais as células permanecem viáveis e metabolicamente activas dependendo da sua localização no biofilme.

Os produtos excretados pelos biofilmes incluem enzimas e outras proteínas, bacteriocinas, solutos de baixa massa e ácidos nucleicos, libertados devido à lise celular.

<sup>2</sup> <http://www.erc.montana.edu/>

As bactérias dos biofilmes encontram-se unidas por uma matriz de “substâncias poliméricas extracelulares” ou “polissacáridos extracelulares” ou mais propriamente EPS como vulgarmente abreviada (Sutherland *et al.*, 2004). Os EPS sintetizados por células microbianas variam muito na sua composição e conseqüentemente nas propriedades químicas e físicas. Os polissacáridos são, essencialmente, cadeias moleculares longas e finas com uma massa molecular da ordem de  $0.5 - 2.0 \times 10^6$  Da, que podem estar associados de formas diferentes. O EPS presente nos biofilmes assemelha-se, quase certamente, aos polímeros sintetizados pelas correspondentes células em suspensão. A quantidade de EPS sintetizado nos biofilmes depende grandemente da disponibilidade de substratos de carbono e do balanço entre carbono e outros nutrientes limitantes (Sutherland, 2001). De acordo com alguns autores esta matriz tem o potencial de prevenir o acesso físico de certos agentes antimicrobianos restringindo a difusão destes para o interior dos biofilmes (Elvers e Lappin-Scott, 2000; Gilbert *et al.*, 1997).

As análises à composição dos biofilmes são difíceis de realizar devido à constante alteração do microcosmo. Os dados laboratoriais são, também, frequentemente enganadores pois os biofilmes são geralmente formados utilizando meios de cultura ricos ao contrário do que sucede, realmente, no ambiente natural (Sutherland *et al.*, 2004).

#### **1.2.4 Estrutura de Biofilmes**

Ao longo da história têm surgido descrições diferentes de estrutura dos biofilmes. O aparecimento de novas tecnologias, incluindo a microscopia confocal (CLSM – *Confocal Laser Scanning Microscopy*), a microscopia de contraste diferencial (DIC- *Differential Interference Contrast*), microelétrodos e outras técnicas, lançou sérias dúvidas relativamente à estrutura homogénea e achatada dos biofilmes até então descrita. Surgiram, então, pelo menos três tipos de estruturas diferentes:

- *estrutura tradicional do biofilme* - vista como uma estrutura plana e homogénea através das observações de amostras de biofilmes com TEM (Nyvad e Fejerskov, 1997);



- *modelo homogéneo em mosaico* – Keevil e Walker em 1992 observaram amostras com DIC e descobriram “pilhas” constituídas por microcolónias de bactérias unidas por substâncias poliméricas extracelulares que apareciam como colunas rodeadas por uma fase líquida na qual se distinguiam protozoários. Por baixo das pilhas parecia existir uma camada de células, com cerca de 5µm de espessura, aderidas ao substrato;

- *forma em cogumelo ou tulipa* – a observação de amostras por CLSM juntamente com o uso de corantes fluorescentes revelou uma estrutura de biofilme semelhante a cogumelo com vários canais através dos quais passa a fase líquida (de Beer *et al.*, 1994; Stoodley *et al.*, 1994).

### 1.3. BIBLIOGRAFIA

- Ackermann H-W (1999) *Tailed bacteriophages: the order Caudovirales*. Adv. Virus Res. **51**:135-201.
- Barksdale L e Arden S B (1974) *Persisting bacteriophage infections, lysogeny, and phage conversions*. Annu Rev Microbiol **25**:265-299.
- Characklis W G (1984) *Biofilm development: A process analysis*. Microbial Adhesion and Aggregation. Ed. K C Marshall, Springer Verlag, NY.
- Characklis W G, Cooksey K E (1983) *Biofilm and microbial fouling*. Adv Applied Microbiol **29**:93-137.
- Costerton J W, Geesey G G, Cheng G K (1978) *How bacteria stick*. Sci Am **238**:86-95.
- Costerton J W, Stewart P S (2001) *Battling biofilms*. Sci Am **285**:74-81.
- Davey M E, O'Toole G A (2000) *Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics*. Microb and Molec Biol Rev. **64**:847-867.
- de Beer D, Stoodley P, Roe F, Lewandowski Z (1994) *Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport*. Biotechnol Bioeng **43**:1131-1138.
- Denhart D D (1975) *The single-stranded ADN bacteriophages*. CRC Crit Rev Microbiol **4**: 161-224.
- Duckworth D (1987) *History and basic properties of bacterial viruses*. Phage Ecology (Goyal S M, Gerba C P, Bitton G. Eds), pp1-44. John Wiley & Sons, New York.
- Duckworth D H, Glenn J, McCorquodale D J (1981) *Inhibition of bacteriophage replication by extrachromosomal genetic elements*. Microbiol Rev **45**:52-71.
- Dudridge J E, Pritchard A M (1983) *Factors affecting the adhesion of bacteria to surfaces*. Proceedings of the Conference on Microbial Corrosion. Teddington pág. 28-35.
- Elvers K E, Lappin-Scott H M (2000) *Biofilms and biofouling*. Encyclop of Microbiol. **1**:478-485.
- Gilbert P, Das J, Foley I (1997) *Biofilms susceptibility to antimicrobials*. Adv Dent Res. **11**:160-167.
- Gill J, Abedon S T (2003) *Bacteriophage ecology of plants*. APSnet Feature Story.

- Goyal S M, Gerba C P, Bitton G (1987) *Phage Ecology*. Wiley-Interscience Publication, U. S. A.
- Hershey A D (1971) *The bacteriophage lambda*. Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Keevil C W, Walker J T (1992) *Normarski DIC microscopy and image analysis of biofilms*. *BINARY* 4:93-95.
- Kornberg A (1980) *DNA replication*. Freeman, San Francisco.
- Krieg N R, Holt J G (1984) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol 1, Williams and Wilkins, London, U.K.
- Lappin-Scott H M, Bass C (2001) *Biofilm formation: attachment, growth, and detachment of microbes from surfaces*. Institute Pasteur Euroconference "Hygiene and Health", Paris, France.
- Leverentz B, Conway W S, Alavidze Z, Janisiewicz W J, Fuchs Y, Camp M J, Chighladze E, Sulakvelidze A (2001) *Examination of bacteriophage as a biocontrol method for Salmonella on fresh-cut fruit: a model study*. *J Food Prot.* 64:1116-1121.
- Levine J A (1939) *Viruses*. Library of congress. Scientific American Library.
- Luria S E, Darnell J E, Baltimore D, Campbell A (1978) *General Virology*. Wiley, New York.
- Marshall K C, Stout R, Mitchell R (1971) *Mechanisms of initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces*. *J Gen Microbiol* 68:337-348.
- McKenna F, El-Tarabily K A, Hardy G E S T, Dell B (2001) *Novel in vivo use of a polyvalent Streptomyces phage to disinfect Streptomyces scabies-infected seed potatoes*. *Plant Pathol.* 50:666-675.
- Meyer B (2003) *Approaches to prevention, removal and killing of biofilms*. *Internat Biodeterior and Biodegrad.* 51:249-253.
- Nyvad B, Fejerskov O (1997) *Assessing the stage of caries lesion activity on the basis of clinical and microbiological examinations*. *Commun Dent Oral Epidem.* 25:69-75.
- Notermans S, Dormans J A M A, Mead G C (1991) *Contribution of surface attachment to the establishment of microorganisms in food processing plants: a review*. *Biofouling* 5:1-16.

- Okabe N, Goto M (1963) *Bacteriophages of plant pathogens*. Ann Rev Phytopathol. **1**:397-418.
- Pelczar M J, Chan E C S, Krieg N R (1993) *Microbiology – Concepts and applications*. McGraw-Hill, Inc. New York.
- Sauer K, Camper A K, Erchlich G D, Costerton J W, Davies D G (2002) *Pseudomonas aeruginosa displays multiple phenotypes during development as a biofilm*. J Bacteriol **184**:1140-1154.
- Sutherland I W (2001) *Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework*. Microbiology. **147**:3-9.
- Sutherland I W, Hughes K A, Skillaman L C, Tait K (2004) *The interaction of phage and biofilms*. FEMS Microbiol Letters **11412**:1-6.
- Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris Jr J G (2001) *Bacteriophage therapy*. Antim Agents and Chemother **45**:649-659.
- Tent G S, Calendar R (1978) *Molecular genetics*. Freeman, San Francisco.
- Wagner E W, Hewlett M (1999) *Basic Virology*. Blackwell Science, Inc.
- Weinbauer M G (2003) *Ecology of prokaryotic viruses*. FEMS Microbiology Reviews. Publicado online 27 Outubro 2003.
- Zoon K C, Habersat M, Scocca J J (1976) *Synthesis of envelope polypeptides by Haemophilus influenzae during development of competence for genetic transformation*. J Bacteriol. **127**:545-554.

## CAPÍTULO 2 - MÉTODOS EXPERIMENTAIS DESENVOLVIDOS E IMPLEMENTADOS

Desde o aparecimento dos fagos, em 1915, os avanços realizados para compreender o modo de replicação e a biologia molecular dos fagos têm sido notáveis. Têm surgido inúmeros métodos de recuperação de fagos através do seu isolamento, purificação e concentração. Os factores fundamentais para a escolha de um método recaem, basicamente, na sua eficiência bem como nos custos associados, rapidez e facilidade de execução.

Existem vários métodos para quantificar fagos que podem ser distinguidos entre métodos directos de contagem total de fagos e métodos indirectos. As contagens indirectas são obtidas através da contagem das unidades formadoras de placas ou halos (PFU – *Plaque forming units*) numa placa de petri com um relvado de células hospedeiras. As contagens dos PFUs representam apenas uma fracção dos fagos totais existentes. Quando se realizam contagens directas, o número de fagos é normalmente 100 a 1000 vezes superior. Este tipo de contagem pode ser realizada utilizando diferentes técnicas, tais como: microscopia electrónica (ME), microscopia de epifluorescência (MEP) e citometria de fluxo (CF). Para a contagem por MEP e CF é necessário a coloração dos fagos com fluorocromos adequados (ex.: DAPI, SYBR Green I, SYBR Gold, etc.). Estes métodos de contagem são bastante rápidos e menos dispendiosos comparativamente com a utilização de ME. A utilização de ME, principalmente de ME de transmissão, tem sido vantajosa para a caracterização morfológica dos diferentes fagos conseguindo-se a observação de estruturas (ex. cauda, cabeça) e, também, a determinação do tamanho dos capsídeos. A sua utilização para efectuar a contagem de fagos totais não é, no entanto, a mais correcta uma vez que ocorrem problemas de ordem técnica na recolha e coloração de fagos, o *washing off* de

fagos das superfícies e têm baixos limites de detecção. Para além destas desvantagens os métodos de contagem total não fornecem a indicação da infectividade do fago ao contrário da contagem por PFUs (Weinbauer, 2003).

Para estudar as interações que decorrem entre fago e hospedeiro é essencial utilizar métodos quantitativos para avaliar o que se sucede ao longo de um período de infecção fágica e para compreender o efeito de alguns parâmetros, tais como: temperatura, meio de cultura, fase de crescimento celular, pH, etc. Estes métodos devem permitir uma detecção baixa de fagos, ser reprodutíveis, práticos, simples, rápidos e não dispendiosos.

Neste trabalho utilizou-se o método de ATP para avaliar o fenómeno de lise celular provocado devido à infecção fágica de células de *Pseudomonas fluorescens*. Encontram-se também descritos neste capítulo os métodos utilizados na enumeração de células de *P. fluorescens* bem como de fagos presentes em amostras. Investigou-se, também, um método espectrofluorimétrico para permitir a enumeração de fagos de um modo mais simples e rápido.

## 2.1. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1.1 Microrganismo e fago

Neste estudo utilizou-se a bactéria *Pseudomonas fluorescens* Migula da colecção americana de culturas (ATCC 27663).

A bactéria foi cultivada em meio de Caldo Nutritivo (MCN) (10g l<sup>-1</sup> de Caldo Nutritivo, 1g l<sup>-1</sup> de glucose, 1.45g l<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O e 0.49g l<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) de Agar) ou em placas de Petri com meio sólido de Caldo Nutritivo (MSCN) (MCN ao qual se juntaram 15g l<sup>-1</sup>) e também armazenadas em 15% de glicerol e a -80°C.

O bacteriófago (fago) utilizado foi o ΦS1 também da colecção americana de culturas.

De acordo com a ATCC a bactéria e o fago foram isolados do solo.

### 2.1.2 Purificação do Fago

Para a purificação do fago utilizaram-se duas metodologias.

#### i) Solução de fago parcialmente purificada e de baixo título

Fez-se crescer uma cultura de *Pseudomonas fluorescens* Migula (ATCC 27663) em MCN durante 24 horas. Posteriormente, infectou-se a mesma com uma solução contendo fago ΦS1. Quando a lise era notória, ou seja, quando a cultura estava praticamente límpida, centrifugou-se a solução (7,000×g, 10min, 4°C) e filtrou-se o sobrenadante através de uma membrana com 0.2µm de porosidade. A solução contendo fago foi armazenada a 4°C até ser necessária.

#### ii) Solução de fago purificada e de título elevado

Cresceram-se culturas de *P. fluorescens* em MCN durante 24 horas. A suspensão foi, posteriormente, centrifugada (7,000×g, 10min, 4°C) e o *pellet* ressuspenso em MCN até uma densidade óptica (D.O.) a 640nm de aproximadamente 1.5. Adicionaram-se num frasco de vidro de 50ml, 1ml desta

suspensão e 1ml de fago diluído em meio de preservação de fago (MPF) ( $0.73\text{gl}^{-1}$  de Trizma base,  $0.5\text{gl}^{-1}$  de gelatina e  $2.5\text{gl}^{-1}$  de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) até um título de aproximadamente  $10^6$ . Após 15 minutos, adicionaram-se 30ml de meio Top Agar a  $45^\circ\text{C}$  (MTA) ( $10\text{gl}^{-1}$  de Caldo Nutritivo,  $1.45\text{gl}^{-1}$  de  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.49\text{gl}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2% (p/vol) de glucose e 0.6% (p/vol) de agar) e verteu-se a mistura para um frasco de cultura de 100ml contendo previamente uma camada fina de MSCN. Após a solidificação da camada de MTA, incubou-se o frasco de cultura durante 7 horas a  $26^\circ\text{C}$ . Após o período de incubação adicionaram-se 30ml de MPF ao frasco de cultura e incubou-se o frasco a  $4^\circ\text{C}$  durante 24h. A fase líquida foi recolhida para *Erlenmeyers* aos quais adicionaram-se, lentamente e sob agitação, NaCl de modo a ter uma concentração final de 1M. Após a dissolução completa do NaCl os *Erlenmeyers* foram colocados em gelo durante 1h. Posteriormente, centrifugou-se a solução ( $11,000\times g$ , 10 minutos,  $4^\circ\text{C}$ ) e verteu-se o sobrenadante para outros *Erlenmeyers*. Ao sobrenadante adicionou-se polietileno glicol 10,000 (PEG 10,000) a 10% (p/vol). A mistura foi incubada durante 16h a  $4^\circ\text{C}$  e posteriormente centrifugada ( $11,000\times g$ , 10 minutos,  $4^\circ\text{C}$ ). Ressuspenderam-se os *pellets*, contendo as partículas fágicas, em MPF. Em tubos de ensaio de 10ml adicionaram-se 6ml de solução contendo fago e 3 ml de clorofórmio. Os tubos foram agitados vigorosamente no vortex durante 30s e seguidamente centrifugados ( $3,000\times g$ , 15 minutos,  $4^\circ\text{C}$ ). A fase superior, contendo fago com um título elevado, foi recolhida cuidadosamente e filtrada através de uma membrana de  $0.2\mu\text{m}$  de porosidade. A solução fágica purificada foi armazenada a  $4^\circ\text{C}$  até ser necessária.

A liofilização da solução fágica é outra possível forma de armazenamento do fago.

### 2.1.3 Métodos para Quantificação de Lise Celular

Neste item serão descritos os métodos estudados para acompanhar a lise celular provocada pela infecção fágica de culturas de *P. fluorescens*.



**i) Densidade Óptica (D.O.)**

Mediu-se a D.O., ao longo do período de infecção fágica, de suspensões de *P. fluorescens*, a um comprimento de onda de 640nm.

Fez-se uma curva de calibração entre a D.O. e o número de células existente. O número de células foi contado por microscopia óptica com a ajuda de uma câmara de *Neubauer*.

**ii) Adenosina Trifosfato (ATP)**

O procedimento de medição de ATP consistiu em colocar 100µl de amostra numa cuvete própria. Em seguida, adicionaram-se 100µl de uma solução contendo luciferina (FL-AAM) e luciferase diluída 25 vezes através do injetor automático do bioluminómetro (Biocounter M 25000).

Os resultados das leituras de ATP são obtidos em termos de RLU (RLU - *Relative Light Units*). Para converter os resultados em concentração de ATP fez-se uma curva de calibração entre os valores de RLU e diferentes concentrações de ATP Standard (FL-AAS).

**2.1.4 Métodos para a Avaliação da Replicação Fágica**

Todos os métodos de avaliação da replicação fágica, utilizados e desenvolvidos, serão descritos em pormenor neste item.

**i) Determinação do Título do Fago em Amostras Puras**

A titulação do fago  $\Phi$  S1 foi realizada de acordo com a técnica descrita por Adams (1959). O método consiste em diluir sucessivamente as amostras contendo fago em meio MPF. A um tubo de ensaio de 4ml adicionaram-se 100µl de fago diluído e 100µl de uma suspensão de *P. fluorescens* (D.O. ~ 1.0). Após 15 minutos adicionaram-se 3 ml de MTA a 45°C e verteu-se a mistura para uma placa de Petri com uma fina camada de MSCN. A placa de Petri foi incubada durante 18 a 24 h a 26°C e finalmente contou-se o número de halos ou placas fágicas (PFU - *Plaque Forming Units*).

Todas as contagens de PFUs foram realizadas em triplicado para três diluições diferentes de fago.

### **ii) Determinação do Título do Fago em Amostras com Células**

Para a determinação do título do fago de uma amostra contendo células foi necessário centrifugar a suspensão (9,600rpm, 10 minutos) para remover as células bacterianas, antes da diluição das amostras em MPF.

O restante procedimento foi igual ao previamente descrito em 2.1.4 i).

### **iii) Microscopia Óptica de Epifluorescência**

A observação do número de fagos por microscopia de epifluorescência foi realizada de acordo com o protocolo desenvolvido por Noble e Fuhrman (1998). A amostra contendo fagos foi centrifugada (9,600rpm, 10 minutos) e em seguida filtrou-se o sobrenadante através de uma membrana de porosidade 0.2 $\mu$ m. Entretanto, colocou-se num sistema de filtração de 25mm uma membrana de 0.45 $\mu$ m e filtraram-se 500 $\mu$ l de água ultra-pura filtrada (0.02 $\mu$ m). Por cima desta membrana, pré-molhada, colocou-se uma membrana de óxido de alumínio de 0.02 $\mu$ m (anodisc, Whatman, 25mm) e filtraram-se 100 $\mu$ l de amostra. O objectivo da utilização de uma membrana de 0.45 $\mu$ m por baixo é evitar que a membrana de 0.02 $\mu$ m quebre devido à força de vácuo aplicada durante a filtração.

Uma vez filtrada a amostra utilizaram-se os seguintes fluorocromos específicos para coloração de ADN – SYBR Green I (Molecular Probes, S-7567) e 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI) (Molecular Probes, D1306).

#### ⇒ Utilização de SYBR Green I

A solução de trabalho de SYBR Green I consiste em 5 $\mu$ l de solução stock (SYBR Green I diluída 10 vezes em água ultra-pura filtrada (0.02 $\mu$ m)) e 95 $\mu$ l de água ultra-pura filtrada (0.02 $\mu$ m).

Após a filtração da amostra, retirou-se a membrana do sistema de filtração (com o vácuo ligado), limpou-se a parte inferior da membrana com papel absorvente e colocou-se a membrana num excicador para secar. Após a secagem, colocou-se uma

gota de solução de trabalho de SYBR Green I numa placa de Petri coberta com papel de alumínio e por cima da gota colocou-se a membrana (com a parte superior, que contém o fago, virada para cima). A placa de Petri foi incubada durante 15 minutos no escuro. Após este período, retirou-se a membrana de cima da gota de SYBR Green I e colocou-se a secar dentro de um excicador (coberto com papel de alumínio).

Esta solução de trabalho de SYBR Green I foi preparada sempre antes de cada utilização, pois perde rapidamente as suas características.

A observação de fagos foi feita num microscópio de epifluorescência utilizando um filtro de 320nm (filtro 2).

#### ⇒ Utilização de DAPI

A solução de trabalho de DAPI consiste em: 4950 $\mu$ l de água ultra-pura filtrada e 50 $\mu$ l de solução stock de DAPI (5mg ml<sup>-1</sup> de DAPI em água ultra-pura filtrada).

Uma vez filtrada a amostra colocou-se, por cima da membrana, 400 $\mu$ l de solução de trabalho de DAPI e deixou-se a actuar durante 30 minutos no escuro. Após este período, a solução de DAPI foi filtrada, a membrana retirada do sistema de filtração e colocada a secar num excicador coberto com papel de alumínio.

A observação das amostras foi feita por microscopia de epifluorescência utilizando os filtros de 320nm e 390nm.

#### **iv) Método Espectrofluorimétrico**

As amostras, contendo fago, foram centrifugadas (7,000 $\times$ g, 10min, 4°C) e, posteriormente, filtradas através de uma membrana de 0.2 $\mu$ m de porosidade.

Preparou-se uma solução de DNase I de 60Uml<sup>-1</sup> em tampão acetato 1M (pH=5) e a respectiva solução substrato que contém: 300 $\mu$ l de amostra contendo fago; 60 $\mu$ l de tampão acetato 1M (pH=5) e 60 $\mu$ l de sulfato de magnésio 0.05M.

A 75 $\mu$ l de substrato adicionaram-se 25 $\mu$ l de DNase I e incubou-se a amostra a 26°C durante 30 e 60 minutos. Prepararam-se também amostras de controlo que consistem em 75 $\mu$ l de solução substrato e 25 $\mu$ l de tampão acetato 1M.

Após a actuação da DNase I utilizaram-se dois fluorocromos específicos para coloração de ADN - o SYBR Green I (Molecular Probes, S-7567) e o DAPI.

⇒ Utilização de SYBR Green I

A solução de trabalho de SYBR Green I, utilizada nos ensaios, é constituída por 5µl da solução stock (SYBR Green I foi diluída 10 vezes em água ultra-pura filtrada (0.02µm)) e 95µl de água ultra-pura filtrada (0.02µm). Esta solução de trabalho foi preparada sempre antes de cada utilização.

Após o período de actuação da DNase I adicionaram-se 100µl da solução de trabalho de SYBR Green I a 25µl da amostra (substrato + DNase I, substrato + tampão acetato). A amostra foi incubada durante 15 minutos no escuro e, posteriormente, mediu-se a intensidade de fluorescência no espectrofluorímetro (utilizando uma cuvete escura). Uma vez que o SYBR Green I resulta em três picos de excitação fez-se um varrimento ao longo do comprimento de onda de excitação (220nm – 510nm), mantendo-se o comprimento de onda de emissão fixo (520nm).

A área dos três picos obtidos foi determinada antes e após a actuação da DNase I.

Para relacionar os valores obtidos com a concentração de ADN fez-se uma curva de calibração com diferentes concentrações de ADN de esperma de salmão que foram posteriormente coradas com solução de trabalho de SYBR Green I.

⇒ Utilização de DAPI

Preparou-se uma solução tampão Tris-DAPI do seguinte modo: a 100ml de tampão Tris (100mM Titriplex III, 10mM Tris-base e 100mM NaCl (pH=7)) adicionaram-se 20µl de solução de DAPI (1mg ml<sup>-1</sup>)

Após o período de actuação da DNase I adicionaram-se 2.5ml de tampão Tris-DAPI a 100 µl de amostra contendo fago. Deixaram-se as amostras a incubar durante 5 minutos no escuro e mediu-se a absorvência no espectrofluorímetro, utilizando uma cuvete transparente de quartzo.

A absorvência antes e após a actuação da DNase I foi medida mantendo os comprimentos de onda de excitação (342nm) e de emissão (450nm) fixos.

Fez-se uma curva de calibração com diferentes concentrações de ADN de esperma de salmão que foram, posteriormente, coradas com tampão Tris-DAPI.

## **2.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A utilização em alguns ensaios de uma solução fágica não purificada (ensaios não incluídos nestes resultados) com restos celulares e um título relativamente baixo não era ideal. Para o efeito, era necessário utilizar um volume maior de solução fágica e também de células. Esta solução não continha, também, componentes no meio que permitissem a preservação do fago. Foi necessário otimizar o processo de purificação fágica, testando-se vários protocolos de purificação e o que apresentou melhores resultados foi o método que envolve a precipitação das partículas fágicas com PEG 10,000 e a sua purificação final com clorofórmio (descrito no item 2.1.2). Este método permitiu a obtenção de uma solução de fago bastante concentrada (título elevado) permitindo a utilização de volumes inferiores de fago. A presença de alguns componentes do meio MPF (ex.: gelatina e sulfato de magnésio) promove a preservação da actividade do fago.

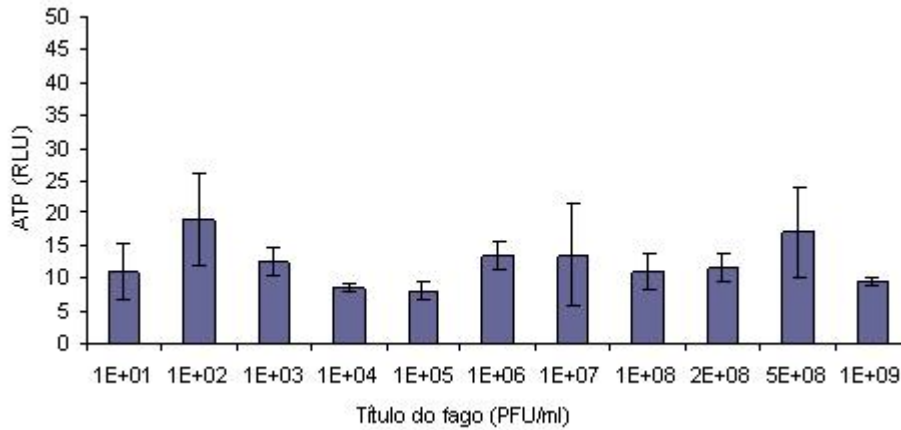
### **2.2.1 Avaliação de Lise Celular – Validação do Método de ATP**

Todos os organismos contêm ATP como fonte principal de energia e quando ocorre ruptura celular há libertação de ATP para o meio extracelular. Este facto torna a medição de ATP um meio para avaliação do fenómeno de lise celular.

Os valores de ATP medidos nos ensaios utilizando um bioluminómetro são sempre medidos em RLUs. Através de uma curva de calibração entre diferentes concentrações de ATP Standard (FL-AAS) e os respectivos valores de RLU foi possível converter os valores para concentração de ATP. A equação resultante desta curva de calibração foi a seguinte:  $[ATP] (\mu\text{g/ml}) = (\text{RLU} - 102.98) \times 10^{-6}$ . Para uniformizar todos os valores, as concentrações de ATP obtidas durante a infecção fágica foram ainda divididas pelo peso seco da biomassa celular utilizada em cada ensaio.

Para validar o método foram necessários diferentes ensaios. Começou-se por estudar se o ATP libertado era dependente tanto da concentração de fago como também

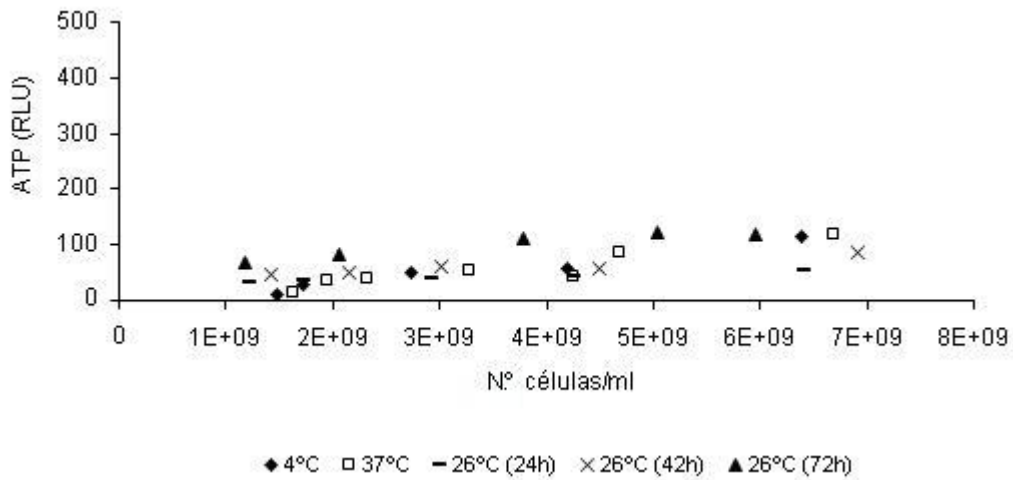
do número de células existentes. Na Figura 2.1 encontram-se os valores para diferentes títulos de fago.



**Figura 2.1** – Valores de ATP (RLU) obtidos para diferentes títulos de fago (PFU/ml).

Como se pode verificar existe uma pequena variação de ATP. Esta variação não é, no entanto, dependente da concentração de fago existente. Os valores de RLU obtidos são mínimos e aproximadamente iguais aos valores de ATP obtidos com água (16-18).

Para avaliar o efeito do número de células e da sua fase metabólica na medição de ATP cresceram-se células a diferentes temperaturas e durante 24h, 48h e 72h. As células foram centrifugadas e seguidamente ressuspensas em meio MCN. Fizeram-se diferentes diluições das suspensões e posteriormente mediu-se o ATP. Os valores obtidos encontram-se registados na Figura 2.2.

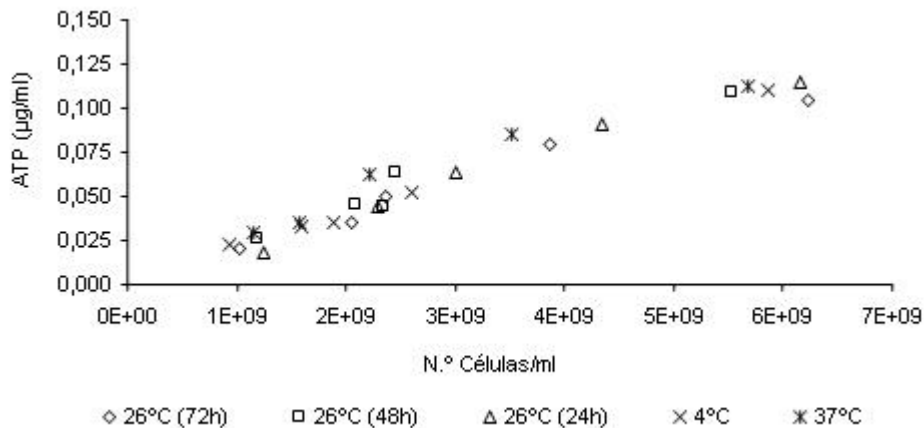


**Figura 2.2** – Valores de ATP (RLU) obtidos para diferentes concentrações de células crescidas a 4°C, 26°C, 37°C e durante 42h e 72h.

A Figura 2.2 mostra que em todos os ensaios, com as células crescidas a diferentes temperaturas e durante os diferentes tempos, há um ligeiro aumento do ATP medido quando o número de células é superior. No entanto, a variação pode ser considerada mínima.

Para se verificar se a quantidade de ATP medido varia com a quantidade de ATP existente no interior de células, crescidas a diferentes temperaturas e durante 24h, 48h e 72h, promoveu-se a ruptura celular sonicando as suspensões (com diferentes números de células) durante 30s, 60s e 120s e a uma potência de 60W (Figura 2.3).

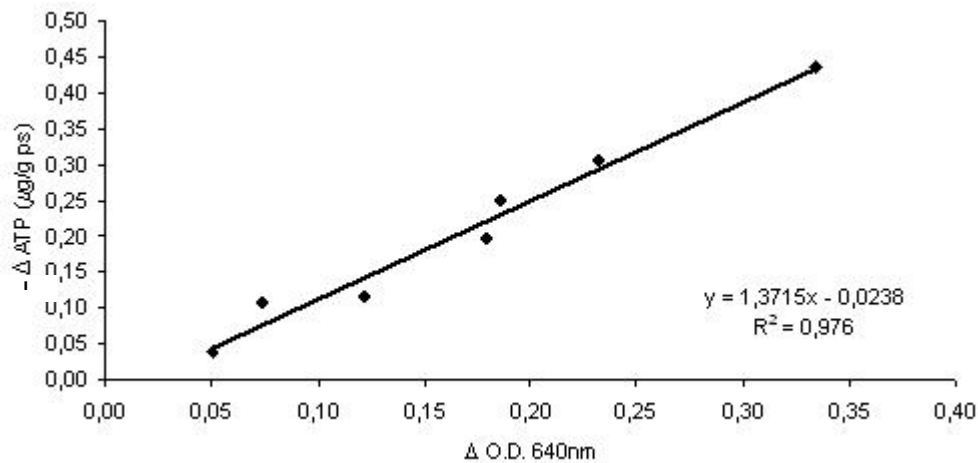




**Figura 2.3** – Concentrações de ATP ( $\mu\text{g/ml}$ ) após sonicação de diferentes concentrações de células crescidas a  $4^\circ\text{C}$ ,  $26^\circ\text{C}$ ,  $37^\circ\text{C}$  e durante 42h e 72h.

Como se pode verificar através da análise da Figura 2.3, a concentração de ATP aumenta com o número de células. Células crescidas às diferentes temperaturas e em diferentes fases de crescimento têm, aproximadamente, a mesma concentração de ATP. A seguinte curva de calibração foi obtida para o aumento da concentração de ATP após sonicação:  $[\text{ATP}] (\mu\text{g/ml}) = 2 \times 10^{-11} \times \text{N}^\circ \text{células} - 7 \times 10^{-5}$ .

Sendo assim, partindo do princípio de que a quantidade de ATP medida não varia nem com a concentração de fago nem com a quantidade existente no interior das células, iniciaram-se os estudos de validação do método de ATP para avaliação do fenómeno de lise celular decorrente de uma infecção fágica. Quando as células começam a lisar a quantidade de ATP aumenta enquanto que a D.O. diminui, devido a uma diminuição da turbidez do meio. Neste período de infecção fágica é possível relacionar ATP com D.O.. A Figura 2.4 mostra a relação obtida entre ATP e D.O. nesse período.

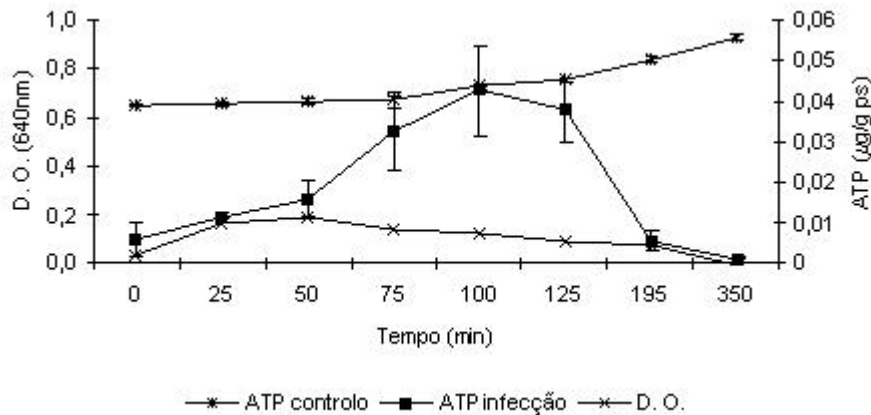


**Figura 2.4** – Variação de ATP ( $\mu\text{g/g ps}$ ) e D.O durante o período de infecção fágica.

Como se pode verificar obteve-se uma relação linear ( $\Delta\text{ATP} = 1.3715 \times \Delta\text{D.O.} - 0.0238$ ) entre o aumento de ATP libertado e o decréscimo da D.O. após a infecção fágica. Esta relação permite validar a utilização do método de ATP para analisar a lise celular provocada pela infecção fágica.

#### Vantagens do método de ATP

A avaliação de lise celular através da medição do ATP tem algumas vantagens relativamente ao método da D.O.. Na figura 2.5 mostra-se o resultado obtido durante a infecção fágica de culturas de *P. fluorescens* crescidas a  $37^\circ\text{C}$  e infectadas a  $26^\circ\text{C}$ .



**Figura 2.5** – Valores de D.O. (640nm) e ATP ( $\mu\text{g/g}_{\text{ps}}$ ) obtidos durante a infecção a  $26^{\circ}\text{C}$  de uma suspensão celular de *P. fluorescens* crescida a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Neste ensaio a lise celular causada pela infecção fágica é baixa. No entanto, ela ocorre uma vez que há um aumento da quantidade de ATP nas amostras contendo fago. O método de ATP é bastante sensível permitindo a detecção de valores extremamente baixos de lise celular.

A medição da D.O. não permite a detecção da lise ocorrida uma vez que a D.O. aumentou, como resultado do crescimento celular, em vez de diminuir. Sendo assim, a aplicabilidade do método da D.O. é limitada não podendo ser utilizada em ensaios em que o crescimento supera a lise celular.

Outra vantagem da técnica de ATP, como se verificará no Capítulo 4, é que a avaliação do fenómeno de lise celular em biofilmes só é possível utilizando este método.

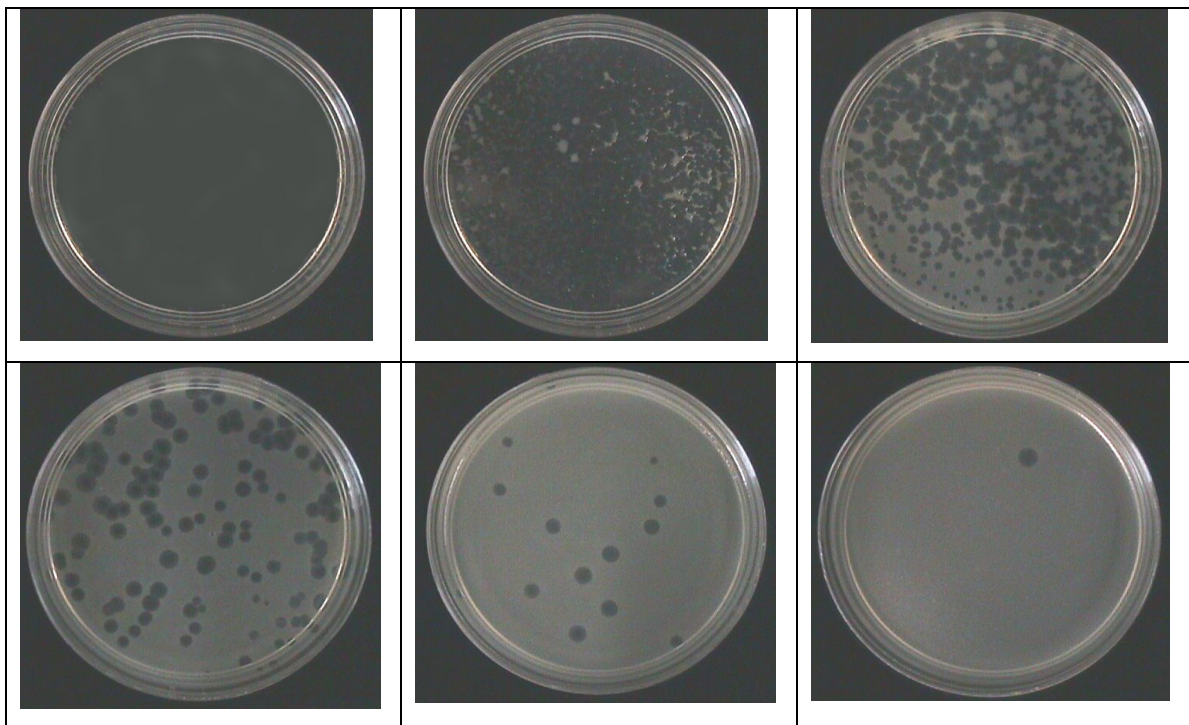
### 2.2.2 Avaliação da Replicação do Fago

A medição quantitativa de centros infecciosos pela técnica descrita por Adams (1959) é a mais utilizada para a enumeração de fagos activos. Os efeitos da infecção de células hospedeiras causam uma destruição ou alterações nas células onde o fago se replica, podendo-se observar estas alterações através do aparecimento de placas ou focos de infecção em placas de Petri com células hospedeiras. Uma partícula fágica capaz de iniciar uma infecção produtiva é designada por PFU (*Plaque Forming Unit*).

As primeiras células infectadas libertam muitos vírus e se não ocorrer difusão, eles permanecerão na proximidade da célula infectada e infectarão células vizinhas. Este processo é repetido inúmeras vezes, no entanto apenas se contará uma placa (Wagner e Hewlett, 1999).

A titulação do fago envolve a diluição da amostra contendo fago, uma vez que só é válida quando a contagem de halos se encontra entre 30 e 300. Neste trabalho houve, ainda, necessidade de diluir a cultura de *P. fluorescens*, porque verificou-se que com D.O.s mais elevadas a contagem dos PFUs era impossível, uma vez que as células conseguiam cobrir toda a placa de Petri.

Na Figura 2.6 encontram-se algumas imagens obtidas com diferentes diluições de uma amostra contendo fagos.



**Figura 2.6** – Diferentes diluições de uma amostra contendo fagos.

Este método permite a determinação do número de fagos activos, no entanto é bastante trabalhosa e morosa, uma vez que se tem de esperar entre 18 a 24 horas para se proceder à contagem dos halos.

Um dos grandes problemas nos estudos com fagos é o tamanho minúsculo dos fagos. Para a enumeração de fagos totais os métodos mais utilizados são a microscopia electrónica e, mais recentemente, a utilização de fluorocromos para a coloração do fago e posterior observação por microscopia de epifluorescência ou citometria de fluxo. A utilização de microscopia electrónica é, no entanto muito dispendiosa. Estudaram-se então técnicas alternativas nomeadamente a utilização de microscopia óptica de epifluorescência e de um método espectrofluorimétrico.

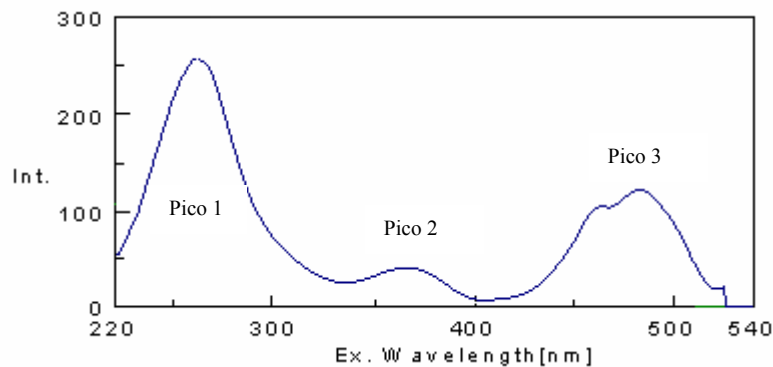
O método de coloração de fagos para observação por microscopia de epifluorescência envolve a filtração de fagos (membrana 0.02 $\mu$ m) Este método serve para se fazer a contagem do número total de fagos, ou seja fagos activos e fagos inactivos. A secagem da membrana antes e após coloração com fluorocromos é essencial para se obter uma fluorescência de boa qualidade e também para minimizar o desaparecimento da fluorescência do corante.

As experiências efectuadas, tanto com SYBR Green I como com DAPI não resultaram plenamente, devido ao tamanho muito reduzido dos fagos o que torna difícil e a sua observação por microscopia óptica a uma ampliação de 1000 $\times$ . A captura de imagem também não foi conseguida, possivelmente devido à resolução do equipamento.

A utilização de um método espectrofluorimétrico envolve, tal como em microscopia de epifluorescência, a coloração do ADN com fluorocromos específicos para esse efeito (SYBR Green I e DAPI).

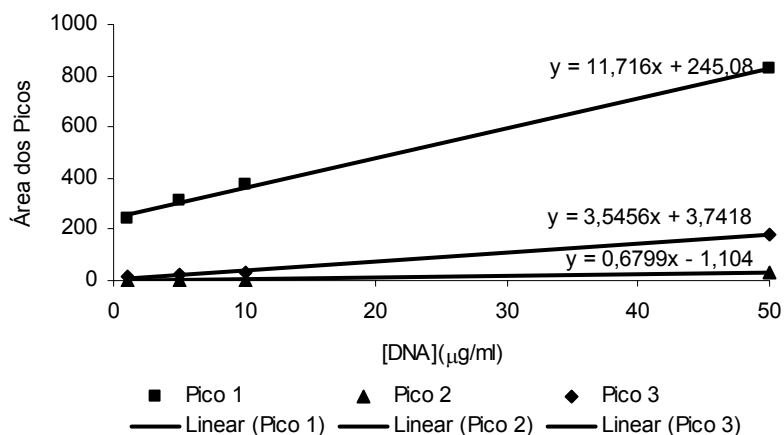
O SYBR Green I e o DAPI são fluorocromos utilizados para a quantificação de células microbianas por espectrofluorimetria portanto, foi necessário adoptar esta técnica para a detecção de fagos. Estes corantes reagem com o par de bases adenina timina e portanto só têm aplicação em fagos de ADN de cadeia dupla.

Foi necessário fazer-se uma curva de calibração com esperma de salmão para se conhecer a gama de concentrações para a qual a intensidade de fluorescência é linear. Prepararam-se soluções com diferentes concentrações de ADN de esperma de salmão. A Figura 2.7 mostra o espectro obtido após a coloração do ADN do esperma de salmão com SYBR Green I.



**Figura 2.7** – Espectro de uma amostra de ADN de esperma de salmão corada com SYBR Green I.

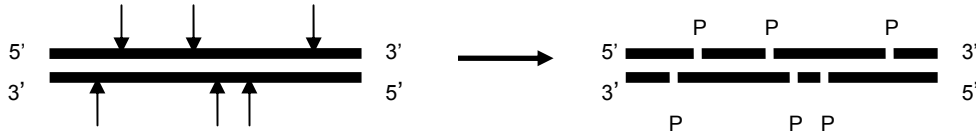
Como se pode observar a partir da Figura 2.7, a coloração com SYBR Green I resulta em três picos de excitação distintos (265nm, 370nm e 490nm). A Figura 2.8 mostra a relação entre concentração de ADN de esperma de salmão e a área de cada pico (1,2 e 3 por correspondência coma Figura 2.7) após coloração com SYBR Green I.



**Figura 2.8** – Curvas de calibração de ADN de esperma de salmão com SYBR Green I.

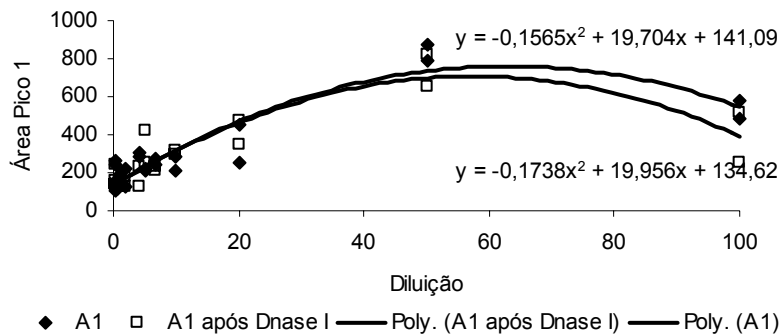
Quando se pretende quantificar fagos por este método numa amostra contendo hospedeiro lisado é necessário eliminar o ADN do hospedeiro para não interferir com os fluorocromos. Assim, utilizou-se uma DNase I do pâncreas bovino que actua em ADN de cadeia simples ou dupla e também em cromatina, no entanto para actuar necessita a presença de  $Mg^{++}$  no meio daí que foi essencial preparar-se uma solução

contendo  $Mg^{2+}$  à qual se chamou solução de substrato. A Figura 2.9 mostra o modo de actuação da DNase I em presença de  $Mg^{2+}$ .

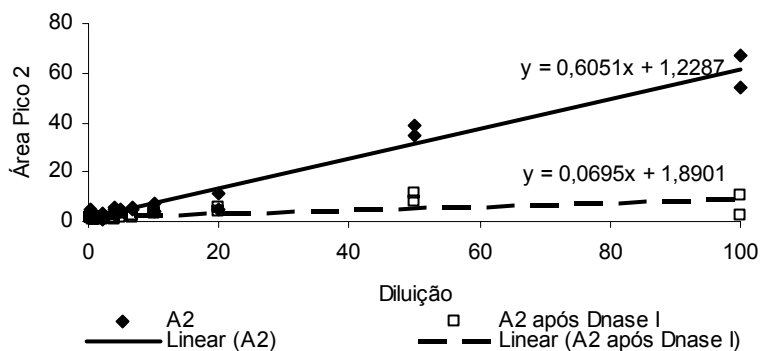


**Figura 2.9** – Actuação da DNase I na presença de  $Mg^{2+}$ .

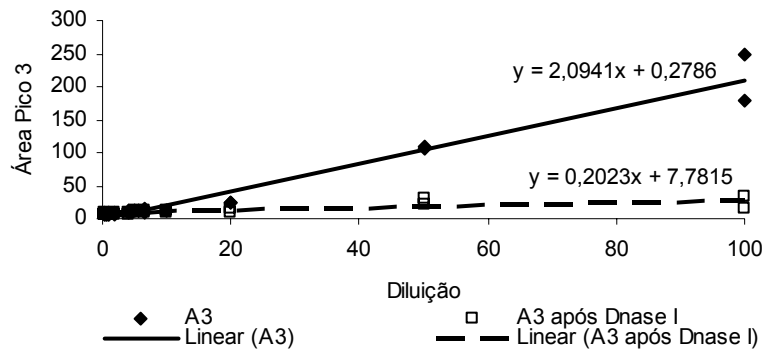
A aplicação de DNase I a amostras contendo ADN celular e ADN fágico resultou numa diminuição das áreas dos picos. As figura seguintes mostram os resultados obtidos antes e após a acção da DNase I para cada um dos três picos de excitação.



**Figura 2.10** – Relação entre a área do pico 1 e a concentração de fago antes e após a actuação da DNase I.



**Figura 2.11** – Relação entre a área do pico 2 e a concentração de fago antes e após a actuação da DNase I.



**Figura 2.12** – Relação entre a área do pico 3 e a concentração de fago antes e após a actuação da DNase I.

Como se pode verificar pela análise das Figuras 2.10, 2.11 e 2.12 há um decréscimo bastante acentuado da área dos picos de excitação 2 e 3. Nestes ensaios para além dos testes espectrofluorimétricos, seguiu-se o efeito da DNase I na actividade do fago através da determinação do título do fago. O título do fago antes e após a DNase I encontra-se na Tabela 2.1.

**Tabela 2.1** – Número de PFUs obtidos antes e após a acção da DNase I.

Antes DNase I (PFU/ml $\times 10^{-8}$ )	Após DNase I (PFU/ml $\times 10^{-8}$ )
$10.2 \pm 1.34$	$1.87 \pm 0.73$
$5.12 \pm 0.98$	$0.76 \pm 0.15$

Como se pode verificar, a diminuição da área dos picos não se deveu apenas à acção da DNase I sobre o ADN celular mas também sobre o ADN fágico, uma vez que houve uma diminuição do número de halos obtidos após a actuação da DNase I. A actuação da DNase I sobre o ADN fágico é resultado das características deste tipo de fago. Provavelmente o facto de não possuir envelope faz com que o fago fique susceptível à acção da DNase I.

Nos ensaios com DAPI procedeu-se do mesmo modo que nos ensaios com SYBR Green I, tendo sido feita uma curva de calibração com ADN de esperma de



salmão. No entanto, uma vez que não é possível a aplicação deste método devido à sensibilidade do fago à DNase I esses valores não serão apresentados, no entanto fica a descrição, tanto do método com SYBR Green I como com DAPI no capítulo de materiais e métodos.

O desenvolvimento de um método espectrofluorimétrico tinha como objectivo facilitar a enumeração de fagos presentes em amostras. Uma curva de calibração entre a quantidade de ADN fágico por espectrofluorimetria e a contagem do número de fagos totais (por microscopia de epifluorescência) poderia simplificar bastante a enumeração de fagos. No entanto, devido à sensibilidade deste fago à DNase I não foi possível concluir este estudo.

Pensa-se, no entanto, que a obtenção de uma curva de calibração entre o número de fagos totais por microscopia de epifluorescência e a quantidade de ADN fágico por espectrofluorimetria pode ser possível utilizando-se uma fago com envelope (não sensível à DNase I).

### **2.3. BIBLIOGRAFIA**

Adams M H (1959) *Bacteriophages*. Interscience, New York, N.Y..

Goyal S M, Gerba C P, Bitton G (1987) *Phage Ecology*. Wiley-Interscience Publication, U. S. A.

Noble R T, Fuhrman J A (1998) *Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria*. *Aquatic Microbial Ecol* **14**:113.

Weinbauer M G (2003) *Ecology of prokaryotic viruses*. *FEMS Microbiology Reviews*. Publicado online 27 Outubro 2003.

## CAPÍTULO 3 - INFECÇÃO FÁGICA DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO

A bactéria *Pseudomonas fluorescens* pertence à família das *Pseudomonadaceae* e é uma bactéria psicrotrófica que se caracteriza por ser Gram-negativa, em forma de bastonete, com flagelos polares e com metabolismo respiratório. Esta espécie é ubíqua no ambiente podendo ser encontrada em ecossistemas naturais e ambientes industriais (Cousin, 1982; Shah, 1994; Swart *et al.*, 1990).

Os fagos são agentes muito importantes no equilíbrio dos ecossistemas, por outro lado, pelas suas características, constituem ferramentas importantes no controlo de bactérias (Ashelford *et al.*, 2003).

O fago  $\Phi$  S1 pertence à família *Podoviridae* caracteriza-se por possuir cabeça, uma cauda pequena e não contráctil com 6 fibras, não possuir envelope e conter uma molécula de ADN de dupla cadeia linear. Este fago quando infecta células hospedeiras tem uma resposta lítica.

A infecção fágica de bactérias é, muitas vezes influenciada por parâmetros ambientais. O meio de crescimento da célula pode influenciar a sua fisiologia e consequentemente a actuação do fago. Em estudos relacionados com a ecologia de fagos em meios aquáticos é essencial estudarem-se parâmetros tais como: a força iónica, a temperatura, a pressão hidrostática. Estes parâmetros afectam, muitas vezes, a adsorção do fago, a própria infecção fágica ou até mesmo a replicação fágica (Goyal *et al.*, 1987). Estudos feitos com fagos específicos para espécies de *E. coli* revelaram que a distribuição dos fagos num ambiente natural depende das condições ambientais desse ecossistema, que determina a qualidade do hospedeiro (Hadas *et al.*, 1997).

Neste capítulo serão abordados os efeitos do meio de infecção, da temperatura e do meio de crescimento na infecção fágica, bem como da fase de crescimento das células hospedeiras.

## 3.1. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1.1 Efeito do Meio de Infecção

Neste trabalho testaram-se três meios para verificar qual o melhor meio de infecção - o meio MCN; água ultra-pura estéril e o meio MPF.

Cresceram-se culturas de *P. fluorescens* em meio MCN, durante 24 horas que foram posteriormente centrifugadas ( $7,000\times g$ , 10 minutos,  $4^{\circ}C$ ). Ressuspendeu-se o *pellet* resultante em cada um dos três meios e acertou-se a D.O. de modo a se terem aproximadamente  $6.3\times 10^9$  células/ml. Em ensaios de infecção fágica utilizaram-se *Erlenmeyers* contendo proporções iguais do respectivo meio, suspensão celular e solução fágica. Em todos os ensaios realizados utilizou-se uma multiplicidade de infecção (MOI - *Multiplicity Of Infection*) inicial, que corresponde ao número médio de fagos por bactéria, de aproximadamente 0.5. Avaliaram-se também controlos que consistem em *Erlenmeyers* com 2 volumes de meio e 1 volume de suspensão celular. Os *Erlenmeyers* foram incubados a  $26^{\circ}C$  e a 130rpm. A lise celular foi medida recorrendo ao método de ATP conforme descrito em 2.1.3. Os resultados são apresentados em número de células lisadas, obtidas pela curva de calibração apresentada na Figura 2.4 (página 36) e pela relação entre D.O a 640nm e número de células ( $N.^{\circ}$  células =  $6E+09\times D.O. + 4E+08$ ).

### 3.1.2 Efeito da Temperatura

Cresceram-se culturas de *P. fluorescens* a diferentes temperaturas ( $4^{\circ}C$ ,  $26^{\circ}C$  e  $37^{\circ}C$ ) até à fase exponencial. Centrifugaram-se as culturas ( $7,000\times g$ , 10 minutos, a  $4^{\circ}C$ ) e ressuspendeu-se o *pellet* resultante em MCN de modo a se terem aproximadamente  $6.3\times 10^9$  células/ml. Para os ensaios de infecção utilizaram-se *Erlenmeyers* com proporções iguais de fago, células crescidas às diferentes temperaturas e meio MCN. A MOI inicial utilizada nestes ensaios foi de aproximadamente 0.5. Prepararam-se também controlos que consistem em 2 volumes de meio MCN e 1 volume de suspensão

celular crescida a cada uma das temperaturas. Os *Erlenmeyers* foram incubados a 4°C, 26°C e 37°C e a 130rpm. Retiraram-se amostras periodicamente para: a avaliação de lise celular através medição da quantidade de ATP e da D.O. (descrito em 2.1.3) e para a quantificação do título do fago (descrito em 2.1.4). Os resultados de lise celular são apresentados em número de células lisadas, obtidas pela curva de calibração apresentada na Figura 2.4 (página 36) e pela relação entre D.O a 640nm e número de células ( $N.^\circ \text{ células} = 6E+09 \times D.O. + 4E+08$ ).

#### **i) Efeito da Temperatura de Infecção**

A avaliação do efeito da temperatura de infecção no processo seguiu um procedimento semelhante ao anteriormente descrito, no entanto, nestes ensaios as células cresceram a 26°C e a infecção decorreu a 4°C, 26°C e a 37°C.

#### **ii) Efeito da Temperatura de Crescimento**

O procedimento de avaliação do efeito da temperatura de crescimento foi semelhante ao previamente descrito, no entanto as culturas de *P. fluorescens* foram crescidas a três temperaturas diferentes (4°C, 26°C e 37°C) e a infecção fágica foi efectuada a 26°C.

### **3.1.3 Efeito da Fase de Crescimento**

Cresceram-se culturas de *P. fluorescens* durante 24, 48 e 72 horas a 26°C e a 130rpm. A infecção fágica foi realizada à temperatura de infecção de 26°C tal como descrita em 3.1.2.

### **3.1.4 Efeito do Meio de Crescimento**

Culturas de *P. fluorescens* foram crescidas a 26°C em 2 meios distintos – o meio MCN e meio de Glucose (MG) ( $5\text{g l}^{-1}$  de glucose,  $2.5\text{g l}^{-1}$  de peptona,  $1.25\text{g l}^{-1}$  de extracto de levedura,  $4.3\text{g l}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  e  $3.75\text{g l}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) até atingirem a fase exponencial de crescimento. De seguida realizou-se a infecção fágica tal como descrito previamente em 3.1.2 sendo a temperatura de infecção 26°C.

### 3.1.5 Proteínas da Membrana Externa

#### i) Extração das Proteínas da Membrana Externa (PME)

Utilizou-se um protocolo de extração das proteínas da membrana externa (PME) da *P. fluorescens* conforme descrito por Masuda *et al.* (1995). Cresceram-se culturas de *P. fluorescens* a diferentes temperaturas (4°C, 26°C e a 37°C), durante diferentes períodos de crescimento (24h, 48h e 72h) e em dois meios de cultura distintos (MCN e MG). Posteriormente as culturas foram centrifugadas (7,000×g, 10 minutos, 4°C) e o *pellet* foi ressuspenso em tampão Tris-HCl 30mM (pH=8). Em seguida, cada suspensão foi sonicada durante 2 minutos a 60W. As células não lisadas foram removidas por centrifugação (7,000×g, 10 minutos, 4°C) e o sobrenadante foi recolhido para ser posteriormente ultracentrifugado (100,000×g, 1 hora, 4°C). O *pellet* resultante, contendo as membranas interna e externa, foi ressuspenso em 1ml de tampão Tris-HCl (pH=8). Adicionou-se a esta solução 1% (p/vol) de N-lauroilsarcosinato de sódio e incubou-se durante 30 minutos a 30°C. Após este período a solução foi centrifugada (18,000×g, 30°C, 40 minutos) e o *pellet* resultante, contendo apenas as proteínas da membrana externa, foi ressuspenso em tampão Tris-HCl para posterior análise por SDS-PAGE.

#### ii) Cálculo da Concentração de Proteína

A concentração de PME foi determinada pelo método do ácido bicinonínico (*Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit* (BCA) (Sigma)) utilizando BSA (bovine serum albumin) como padrão. O protocolo consiste em colocar 25µl de amostra em poços de uma placa de Elisa e adicionar 200µl de uma solução de trabalho composta por 50 partes de solução BCA A e 1 parte de solução BCA B. A placa de Elisa foi, então, incubada durante 30 minutos a 37°C e posteriormente arrefecida até à temperatura ambiente. Após o arrefecimento, a absorvência foi medida a um comprimento de onda de 562nm. A concentração de PME foi acertada, com tampão Tris-HCl (pH=8), de modo a se ter aproximadamente 250µg ml<sup>-1</sup> de proteína.

### iii) Electroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Recorreu-se à técnica de electroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) conforme descrita por Laemmli (1970) para análise das PME.

#### ⇒ Preparação do gel de poliacrilamida

Na Tabela 3.1 encontram-se os volumes necessários para se produzirem 2 géis de poliacrilamida de 12%.

**Tabela 3.1** – Volumes utilizados na preparação de 2 géis de poliacrilamida de 12%.

GEL*	Gel (%)	Água destilada (ml)	30% Bis-Acrilamida (ml)	Tampão gel (ml)	10% SDS (ml)
R	12	5.10	6.00	3.75 <sup>1</sup>	0.15
S	12	3.40	4.00	2.50 <sup>2</sup>	0.10

\* I – Gel *resolving*; S – Gel *stacking*

<sup>1</sup> Tampão gel pH=8.8

<sup>2</sup> Tampão gel pH=6.8

O gel *resolving*, ao qual foram adicionados 90µl de persulfato de amoníaco 10% (PSA) e 9µl de TEMED, foi colocado no sistema e deixado a polimerizar durante aproximadamente 30 minutos. Ao gel *stacking* adicionaram-se 60µl PSA 10% e 6µl de TEMED e após a polimerização do gel *resolving* este foi colocado no sistema juntamente com os pentes para se formarem os poços. Após a polimerização removem-se os pentes e colocaram-se os vidros na tina de electroforese contendo tampão TGS.

#### ⇒ Preparação das amostras para SDS-PAGE

A 15µl de amostra foram adicionados 5µl de tampão da amostra (25mM Tris-HCl a pH 6.8, 10% β-mercaptoetanol, 10% SDS, 0.1% de bromofenol blue e 30% de glicerol). A amostra foi colocada durante 5 minutos num banho a 100°C para desnaturar as proteínas e em seguida em gelo para arrefecer. Adicionaram-se, a cada poço do gel de poliacrilamida, 15µl de amostra resultante da desnaturação. O gel foi submetido a uma corrente de 7mA durante aproximadamente 3 horas e 30 minutos.



**iv) Coloração com Coomassie blue e com Prata**⇒ Coloração com Coomassie blue

No final da electroforese separaram-se os vidros e colocaram-se os géis durante 30 minutos numa solução de Coomassie blue (50% de metanol, 10% de ácido acético, 0.05% de Coomassie brilliant blue R e 40% de água destilada). Após este período, a solução de Coomassie blue foi retirada e adicionou-se uma solução descorante (30% metanol, 10% ácido acético e 60% de água destilada), durante 5 minutos. A solução foi, seguidamente, retirada para se adicionar novamente solução descorante. Os géis foram deixados nesta solução durante 16 horas sob agitação (80rpm). No final, retirou-se a solução descorante e colocaram-se os géis em água destilada.

⇒ Coloração com Prata

A coloração com prata foi realizada colocando os géis, após coloração com Coomassie blue, durante 10 minutos em água destilada. No final a água destilada foi retirada e adicionou-se tiosulfato de sódio ( $0.2\text{gl}^{-1}$ ), apenas por cima de cada gel, deixando-se a actuar durante 1 minuto. O tiosulfato de sódio foi retirado e adicionou-se, posteriormente, água destilada ( $2 \times 20$  segundos). Após a água destilada colocou-se, por cima de cada gel, solução de nitrato de prata ( $2\text{gl}^{-1}$ ) e deixou-se a actuar durante 30 minutos. O nitrato de prata foi recolhido e colocou-se água destilada por cima dos géis (10 segundos). Retirou-se a água destilada e adicionou-se, por cima de cada gel, solução de revelação ( $0.7\text{ml}^{-1}$  de formaldeído 37%,  $30\text{gl}^{-1}$  de carbonato de potássio anidro e  $10\text{mg}^{-1}$  de tiosulfato de sódio) e deixou-se a actuar até os géis ficarem com a cor desejada ( $2 \times 3$  minutos, aproximadamente). No final adicionou-se solução de paragem ( $50\text{gl}^{-1}$  de Tris-base e 2,5% de ácido acético) e deixou-se a actuar durante 1 minuto. Os géis foram envolvidos em película aderente para evitar a desidratação ou colocados em água destilada.

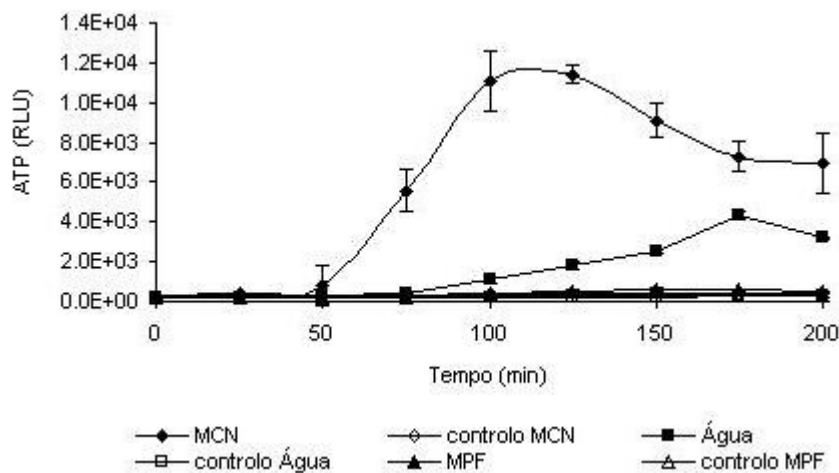
### **3.1.6 Análise Estatística**

Para comparar as taxas de lise celular e de libertação de fagos utilizou-se o método estatístico “*one-way analysis of variance*” (One-way ANOVA) seguido de testes *post hoc* utilizando o teste de Tukey. Em todas as análises realizadas o intervalo de confiança utilizado foi de 95%. Estes testes foram realizados utilizando o programa SPSS (versão 11.5) para Windows.

## 3.2. RESULTADOS

### 3.2.1 Efeito do Meio de Infecção

O meio de infecção é fundamental para que o fago consiga infectar células em suspensão. As células para estes estudos foram crescidas em meio MCN, no entanto após centrifugação foram ressuspensas em: MCN, MPF e água ultra-pura estéril. A Figura 3.1 mostra a variação obtida em cada um destes ensaios.

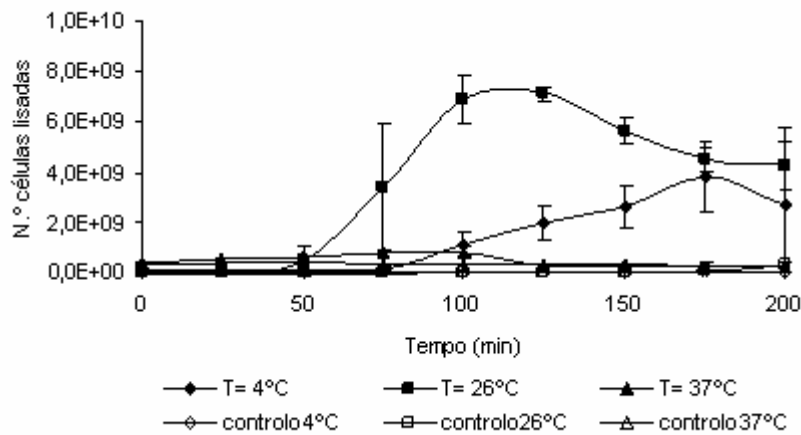


**Figura 3.1** – Infecção fágica de suspensões em diferentes meios de infecção.

Conforme se pode verificar, a lise celular foi mais extensa quando a infecção decorreu em meio MCN. Assim, este foi o meio de infecção utilizado no restante trabalho experimental.

### 3.2.2 Efeito da Temperatura

A Figura 3.2 mostra o resultado obtido após a infecção fágica a 4°C, 26°C e 37°C de culturas de *P. fluorescens* crescidas a diferentes temperaturas. Os controlos são culturas de *P. fluorescens* crescidas às mesmas temperaturas, mas não incubadas com fago.



**Figura 3.2** – Infecção fágica a 4°C, 26°C e 37°C de culturas de *P. fluorescens* crescidas às mesmas temperaturas (4°C, 26°C e 37°C).

Conforme se pode verificar, a partir da Figura 3.2, a lise celular ocorreu apenas nas amostras contendo fago, uma vez que o número de células lisadas não aumenta nos controles. A ação do fago foi, também, distinta às diferentes temperaturas, obtendo-se uma lise superior com células crescidas e infectadas a 26°C.

A taxa de lise celular ( $k$ ) foi calculada através da equação  $\log_{10}(N/N_0)/t$  em que  $N_0$  e  $N$  são o número de células lisadas antes e após o período exponencial de lise.

A partir dos valores da titulação fágica calculou-se a taxa de libertação de fago (PFU/t) a partir da seguinte equação:  $PFU/t = (PFU_{MAX} - PFU_{MIN})/t$ . Em que  $PFU_{MAX}$  e  $PFU_{MIN}$  são os valores máximo e mínimo de PFU obtidos e  $t$  o período de tempo entre esses valores.

**Tabela 3.2** – Parâmetros de infecção fágicos obtidos para culturas celulares crescidas e infectadas a 4°C, 26°C e a 37°C.

T(°C)	k (min <sup>-1</sup> )	PFU <sub>MAX</sub> ×10 <sup>-10</sup> (PFU ml <sup>-1</sup> )	PFU/t×10 <sup>-8</sup> (PFU ml <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	L (min)
4	0.010 ± 0.001	1.50 ± 0.85	1.85 ± 1.09	75
26	0.024 ± 0.008	8.50 ± 0.14	16.90 ± 0.28	50
37	0.003 ± 0.001	(a)	(a)	(a)

<sup>(a)</sup> Não houve aumento do título do fago

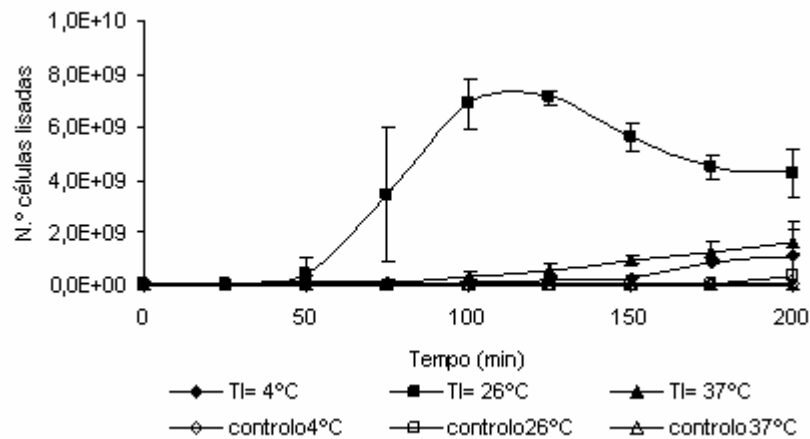
Os parâmetros de infecção (k e PFU/t) obtidos a cada temperatura variaram bastante ( $p < 0.05$ ). A 37°C não houve aumento do número de fagos e esse facto observou-se também na taxa de lise celular. Células crescidas e infectadas a 26°C resultaram em taxas de lise celular e de libertação de fagos elevadas. O período de latência (L) definido como o intervalo de tempo entre a infecção fágica e o aparecimento de fagos, foi superior quando a infecção e crescimento ocorreram a 4°C.

Para verificar se estes resultados eram devido ao facto de se terem crescido as culturas a diferentes temperaturas ou se eram resultado da temperatura de infecção fágica, decidiu-se investigar estes dois efeitos.

### **i) Efeito da Temperatura de Infecção Fágica**

Estes estudos foram realizados crescendo suspensões celulares a uma temperatura fixa (26°C) e infectando-as a diferentes temperaturas. Nestes ensaios estudou-se a lise celular (ATP) e a replicação do fago (PFU) para melhor se compreender o fenómeno de infecção fágica.

A Figura 3.3 mostra o número de células lisadas, em cada período de infecção, para as diferentes temperaturas de infecção estudadas.



**Figura 3.3** – Infecção fágica a 4°C, 26°C e 37°C de culturas de *P. fluorescens* crescidas a 26°C.

Através da Figura 3.3 pode-se afirmar que a temperatura com a qual se obteve uma melhor lise celular foi 26°C. Nos controlos não houve lise celular, uma vez que não se observou um aumento do número de células lisadas.

Na Tabela 3.3 encontram-se os parâmetros de infecção obtidos após infecção fágica a cada temperatura de infecção estudada.

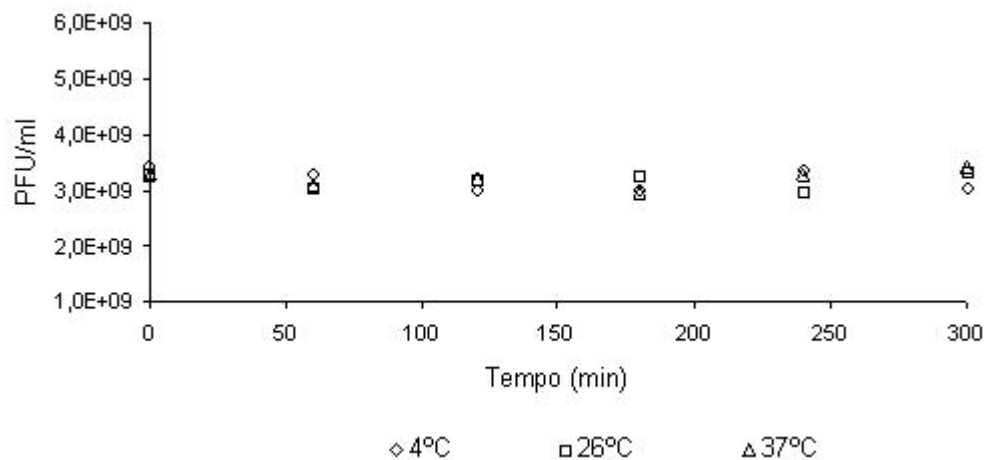
**Tabela 3.3** – Parâmetros de infecção fágicos obtidos para culturas celulares crescidas a 26°C e infectadas a  $T_I$ .

$T_I$ (°C)	$k$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$\text{PFU}_{\text{MAX}} \times 10^{-10}$ ( $\text{PFU ml}^{-1}$ )	$\text{PFU}/t \times 10^{-8}$ ( $\text{PFU ml}^{-1} \text{min}^{-1}$ )	L (min)
4	$0.009 \pm 0.003$	$3.47 \pm 0.32$	$3.22 \pm 0.26$	50
26	$0.024 \pm 0.008$	$8.50 \pm 0.14$	$16.90 \pm 0.28$	50
37	$0.011 \pm 0.002$	$0.19 \pm 0.06$	$0.12 \pm 0.05$	75

Os valores obtidos mostram que, tal como anteriormente referido, 26°C foi a temperatura ótima de infecção e que houve diferenças significativas entre os parâmetros obtidos às diferentes temperaturas ( $p < 0.05$ ). As suspensões infectadas a 26°C resultaram nos valores máximos tanto de taxa de lise celular, bem como de taxa de

libertação de fago. Comparativamente com 4°C, a taxa de libertação de fagos foi aproximadamente 5.25 vezes superior quando a infecção ocorreu a 26°C. A libertação de fagos a 37°C foi a menor. A esta temperatura também o período de latência foi o superior.

Para avaliar se a temperatura de infecção afectava a viabilidade do fago, determinou-se a quantidade de fagos activos (PFU/ml) ao longo do tempo após se submeterem amostras às diferentes temperaturas em estudo. Na Figura 3.4 encontram-se os resultados desse estudo na actividade do fago.



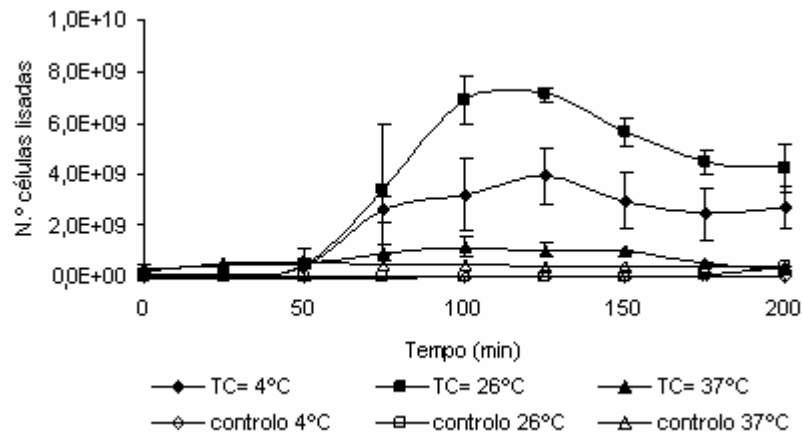
**Figura 3.4** – Efeito da temperatura na actividade do fago.

Pelos valores apresentados na Figura 3.4 pode-se concluir que a temperatura não influencia, durante o período de tempo estudado, a viabilidade do fago, tendo-se obtido valores praticamente constantes de PFUs.

### ii) Efeito da Temperatura de Crescimento Celular

Nos estudos para avaliação do efeito da temperatura de crescimento cresceram-se suspensões celulares a diferentes temperaturas que foram posteriormente infectadas a uma temperatura fixa de 26°C, ou seja, à temperatura óptima de infecção, tal como previamente demonstrado.

A Figura 3.5 mostra os resultados obtidos em termos do número de células lisadas durante a infecção fágica das suspensões.



**Figura 3.5** – Infecção fágica a 26°C de culturas de *P. fluorescens* crescidas a 4°C, 26°C e a 37°C.

A temperatura de crescimento óptima para a infecção fágica foi 26°C, uma vez que a esta temperatura o fago conseguiu lisar um maior número de células.

Na Tabela 3.4 encontram-se os parâmetros de infecção fágica obtidos com culturas de *P. fluorescens* crescidas às diferentes temperaturas, bem como a taxa de crescimento obtida ( $\mu$  ( $\text{h}^{-1}$ )) a cada temperatura.

**Tabela 3.4** – Parâmetros obtidos após infecção fágica a 26°C de culturas de *P. fluorescens* crescidas a 4°C, 26°C e 37°C e respectivas taxas de crescimento ( $\mu$ ).

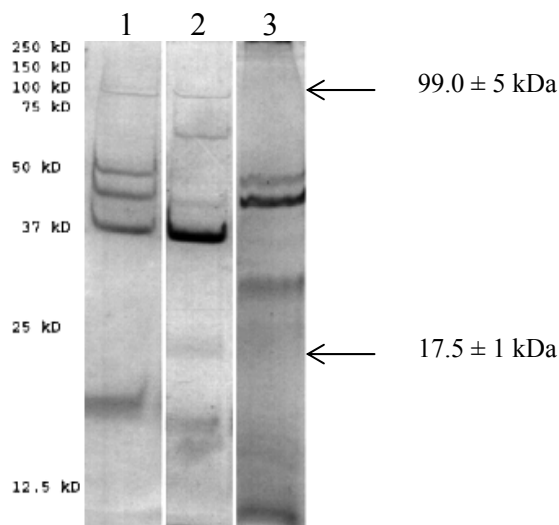
$T_G$ (°C)	$\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$k$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$\text{PFU}_{\text{MAX}} \times 10^{-10}$ ( $\text{PFU ml}^{-1}$ )	$\text{PFU}/t \times 10^{-8}$ ( $\text{PFU ml}^{-1} \text{min}^{-1}$ )	L (min)
4	$0.36 \pm 0.11$	$0.014 \pm 0.008$	$2.377 \pm 0.11$	$4.29 \pm 0.07$	50
26	$0.53 \pm 0.10$	$0.024 \pm 0.008$	$8.50 \pm 0.14$	$16.90 \pm 0.28$	50
37	$0.29 \pm 0.16$	$0.010 \pm 0.001$	$0.26 \pm 0.01$	$0.35 \pm 0.01$	50

Os resultados indicam que 26°C foi a temperatura de crescimento com a qual se obteve os valores máximos das taxas de lise celular e de libertação de fagos. Os parâmetros de infecção das células crescidas a esta temperatura foram significativamente diferentes das da infecção de células crescidas a 4°C e a 37°C ( $p < 0.05$ ). A taxa de libertação de fagos foi aproximadamente 3.94 vezes superior a 26°C do



que a 4°C. A 37°C a lise mostrou ser bastante inferior, sendo por isso a libertação de fagos, também, mínima. Verificou-se também que a temperatura de crescimento não afectou o período de latência.

Para se tentar compreenderem as razões que levaram a estas diferenças de comportamento do fago, decidiu-se analisar as PME existentes em células crescidas a cada uma das temperaturas. A Figura 3.6 mostra o resultado da electroforese realizada.

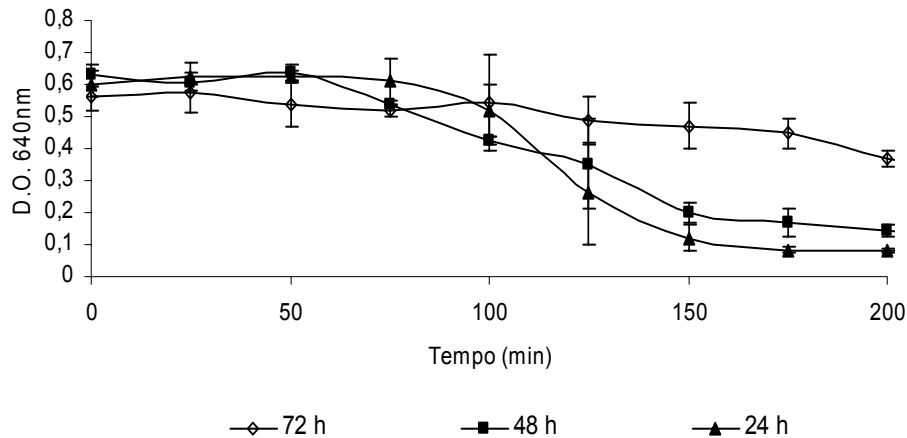


**Figura 3.6** – Electroforese em gel de poliacrilamida das proteínas da membrana externa de células crescidas a 4°C (coluna 1), 26°C (coluna 2) e a 37°C (coluna 3).

A partir da Figura 3.6 verifica-se que culturas crescidas a 4°C e a 37°C têm perfis de bandas distintos dos de culturas crescidas a 26°C. Tanto em células crescidas a 4°C como células crescidas a 37°C não se observa a banda proteica de  $17.5 \pm 1$  kDa. Células crescidas a 37°C também não apresentam a banda proteica a  $99.0 \pm 5$  kDa existente em células crescidas tanto a 4°C como a 26°C.

### 3.2.3 Efeito da Fase de Crescimento Celular

Nestes ensaios infectaram-se células de *P. fluorescens* na fase exponencial, estacionária e de declínio. A Figura 3.7 mostra a diminuição da D.O. a 640nm ao longo do período de infecção fágica.



**Figura 3.7** – Diminuição da D.O. durante o período de infecção fágica de células na fase exponencial, estacionária e de declínio.

Como se verifica na Figura 3.7, a infecção foi mais lenta para períodos de crescimento celular mais longos.

Na Tabela 3.5 encontram-se os parâmetros de infecção obtidos com células na fase exponencial (24h), estacionária (48h) e de declínio (72h).

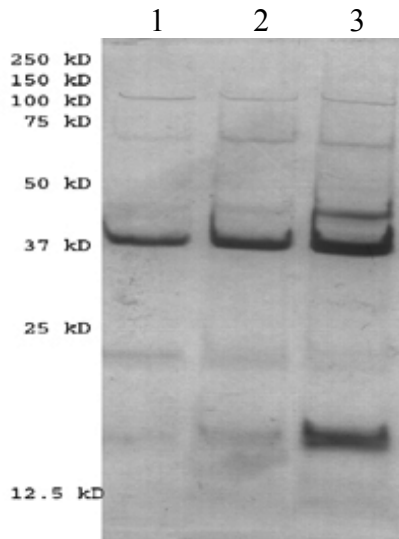
**Tabela 3.5** – Parâmetros obtidos após infecção fágica a 26°C de culturas de *P. fluorescens* na fase exponencial, estacionária e de declínio.

Fase	$k$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$\text{PFU}_{\text{MAX}} \times 10^{-10}$ ( $\text{PFU ml}^{-1}$ )	$\text{PFU}/t \times 10^{-8}$ ( $\text{PFU ml}^{-1} \text{min}^{-1}$ )	$L$ (min)
Exponencial	$0.024 \pm 0.008$	$8.50 \pm 0.14$	$16.90 \pm 0.28$	50
Estacionária	$0.017 \pm 0.002$	$8.15 \pm 2.05$	$7.45 \pm 0.18$	50
Declínio	$0.012 \pm 0.001$	$3.06 \pm 0.57$	$1.96 \pm 0.37$	100

De acordo com estes resultados a eficiência de infecção, em termos dos valores de  $k$  e  $\text{PFU}/t$ , diferiu significativamente ( $p < 0.05$ ) e foi diminuindo à medida que as células foram envelhecendo. A taxa de libertação de fagos foi aproximadamente 2.27 vezes superior com células na fase exponencial comparativamente ao obtido com células nas fases estacionária e 8.62 em relação à infecção de células na fase de declínio. O período de latência também foi alterado com a fase de crescimento celular,

verificando-se um longo período de latência quando a infecção ocorreu em células na fase de declínio.

Tal como nos estudos do efeito da temperatura de crescimento, as PME foram extraídas e analisadas por SDS-PAGE. A Figura 3.8 mostra os perfis dos géis obtidos com células na fase exponencial, estacionária e de declínio.



**Figura 3.8** – Electroforese em gel de poliacrilamida das proteínas da membrana externa de células na fase exponencial (coluna 1), estacionária (coluna 2) e de declínio (coluna 3).

Conforme se pode observar a partir da Figura 3.8, as bandas proteicas das células nas diferentes fases de crescimento são idênticas. A única diferença observada tem a ver com a concentração de algumas das bandas existentes.

### 3.2.4 Efeito da Meio de Crescimento

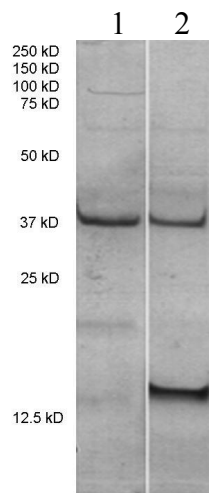
Nestes ensaios decidiu-se testar dois meios de cultura bastante utilizados para o crescimento de *P. fluorescens* – o meio MCN e o meio MG. Na Tabela 3.6 apresentam-se os parâmetros de infecção obtidos com os dois meios testados.

**Tabela 3.6** – Parâmetros obtidos após infecção fágica de culturas de *P. fluorescens* crescidas em meio MCN e MG.

Meio de Crescimento	Meio de Infecção			
	MG		MCN	
	k (min <sup>-1</sup> )	PFU/t×10 <sup>-8</sup> (PFU ml <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	k (min <sup>-1</sup> )	PFU/t×10 <sup>-8</sup> (PFU ml <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )
MG	0.005 ± 0.001	0.29 ± 0.02	0.003 ± 0.001	0.09 ± 0.01
MCN	0.021 ± 0.001	4.28 ± 0.63	0.024 ± 0.008	16.90 ± 0.28

De acordo com os resultados da Tabela 3.6 a infecção de células crescidas em meio MG foi pouco eficaz e significativamente diferente da infecção de células crescidas em MCN ( $p < 0.05$ ). Células crescidas em meio MG resultaram em baixas taxas quer de lise celular como de libertação de fagos. Culturas crescidas em meio MCN quando infectadas em meio MG resultaram num decréscimo da taxa de libertação de fagos, no entanto a taxa de lise foi semelhante à obtida quando a infecção decorreu em meio MCN.

Para compreender se estas alterações se devem à presença de diferentes bandas proteicas realizou-se electroforese em gel de poliácridamida das PME. A Figura 3.9 mostra os perfis das PME extraídas de células crescidas nos dois meios testados.



**Figura 3.9** – Electroforese em gel de poliácridamida das proteínas da membrana externa de células crescidas em meio MCN (coluna 1) e em meio MG (coluna 2).

Tal como se observou nos estudos sobre o efeito da temperatura de crescimento, as células crescidas em meio MG não apresentaram as bandas correspondentes às proteínas com os seguintes pesos moleculares:  $17.5 \pm 1\text{kDa}$  e  $99.0 \pm 5\text{kDa}$ .

### 3.3. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A maioria dos estudos realizados com fagos são efectuados sob condições óptimas de infecção e crescimento celulares. Este estudo permite o conhecimento do comportamento do fago  $\Phi$ S1 em condições não ideais, estudando-se assim: o efeito da variação da temperatura de crescimento celular e da temperatura de infecção fágica, o efeito da fase de crescimento do hospedeiro e o efeito do meio de infecção fágica e do meio de crescimento celular.

A variação do meio de infecção mostrou que a infecção fágica de células em meio MCN foi a que resultou numa maior lise celular. A infecção em MPF foi ineficaz (Figura 3.1).

Quando se fez crescer e se infectou as células do hospedeiro à mesma temperatura foi possível verificar que a temperatura afecta tanto a lise celular obtida como também a quantidade de fagos produzidos (Figura 3.2 e Tabela 3.2). Para se compreender o efeito da temperatura estudou-se a acção da temperatura de infecção e da temperatura de crescimento em separado, realizando-se ensaios nos quais se manteve uma temperatura de crescimento celular fixa e variou-se a temperatura de infecção fágica e também ensaios nos quais se variou a temperatura de crescimento celular e se manteve a temperatura de infecção fixa. A temperatura fixa escolhida, tanto para os ensaios sobre o efeito da temperatura de infecção bem como para os ensaios sobre o efeito da temperatura de crescimento, foi 26°C, uma vez que esta temperatura foi a que permitiu a obtenção de valores superiores de lise celular bem como de libertação de fagos (Figura 3.2 e Tabela 3.2).

A temperatura de infecção óptima foi 26°C. Com esta temperatura obtiveram-se as maiores taxas de lise celular e de libertação de fagos (Tabela 3.3). A infecção a 37°C resultou na menor eficiência de infecção. De acordo com um estudo realizado por Rossi e Aragno (1999) a exposição de fagos a temperaturas elevadas provoca a inactivação do fago. Para estudar a possibilidade de ocorrência deste facto com as amostras infectadas a 37°C, colocaram-se soluções contendo fago e meio MCN durante 5 horas, a 130rpm, a

cada uma das temperaturas de infecção. Durante este período não se observou a perda da actividade do fago (Figura 3.4) uma vez que o título do fago se manteve constante. A inactivação do fago a 37°C não pode, portanto, ser a explicação para o que se sucede a esta temperatura. A 37°C observou-se um aumento da fase de latência provavelmente devido a uma inibição da síntese de proteínas celulares. De acordo com Young *et al.* (2000) uma diminuição do período de latência pode ser associado com a modificação das endolisinas responsáveis pela digestão da parede celular que são controladas pelas holinas.

O efeito da temperatura de crescimento afecta a infecção fágica (Figura 3.5). As células crescidas a 26°C resultaram num maior número de fagos por célula infectada. A esta temperatura, a taxa específica de crescimento foi superior à taxa de crescimento a 4°C e 37°C (Tabela 3.4). Alguns autores relataram que a taxa de libertação de fagos aumenta com a taxa específica de crescimento, enquanto que se observa também uma diminuição do período de latência (Hadas *et al.*, 1997). As alterações do crescimento celular podem ocorrer simultaneamente com modificações da composição macromolecular, taxa metabólica e tamanho da célula (Donachie e Robinson, 1987; Ingraham *et al.*, 1983). Hadas *et al.* (1997) sugeriu que o tamanho da célula, ao contrário da taxa metabólica, é um dos factores que afecta a actividade do fago T4 sobre células de *E. coli*. No caso de células de *P. fluorescens* a temperatura de crescimento influencia o tamanho e a forma da célula (Guillou *et al.*, 1995). De acordo com Guillou e Guespin-Michel (1995) à temperatura óptima de crescimento as células de *P. fluorescens* exibem uma maior concentração de proteínas e ARN. Por esse motivo supõe-se que neste estudo as células crescidas a 26°C são maiores com uma maior superfície à qual os fagos podem adsorver, o que provavelmente explica a maior eficiência obtida.

Um dos factores mais importantes num processo de infecção fágica é a presença de receptores na parede celular. A membrana externa das culturas crescidas a 37°C não exibem as bandas proteicas de  $17.5 \pm 1$  kDa e de  $99 \pm 5$  kDa, enquanto as células crescidas a 4°C não exibem a banda proteica a  $17.5 \pm 1$  kDa, que estão presentes em células crescidas a 26°C (Figura 3.6). Estas duas bandas proteicas são provavelmente essenciais para a adsorção de fagos.

No ambiente, as células existem sobretudo na forma de biofilme. Um biofilme é caracterizado por ter células em diferentes fases de crescimento envolvidas numa matriz polissacárida. Foi portanto estudado o efeito da fase de crescimento celular na infecção fágica. Os resultados obtidos mostram que a infecção de células na fase exponencial foi mais eficiente do que a infecção de células nas fases estacionária e de declínio, uma vez que se obtiveram valores superiores de lise celular e de número de fagos libertados e também um menor período de latência (Tabela 3.5). A transição da fase exponencial para a fase estacionária resulta numa alteração dramática da morfologia celular, das taxas de síntese macromolecular e de degradação, da constituição e características superficiais da parede celular (Kjelleberg *et al.*, 1987; Rossi e Aragno, 1999). De acordo com Hadas *et al.* (1997) o período de latência, o período de eclipse, o período de libertação e a taxa de adsorção fágica são influenciados pela fisiologia da célula hospedeira (ex.: qualidade da célula). Este facto pode ser responsável pelo aumento do período de latência quando as células se encontram na fase de declínio. Em termos de qualidade do hospedeiro é possível que as células na fase de declínio tenham uma qualidade inferior à qualidade das células na fase exponencial. Os trabalhos de Propst-Ricciuti (1972, 1976) sugerem que um atraso da lise celular pode ser devido à divisão celular, uma vez que as células na fase estacionária libertam novos vírus apenas quando estas voltam a crescer. Esta parece ser uma das explicações para os valores baixos de taxa de lise celular e de libertação de fagos quando as células se encontram nas fases estacionária e de declínio. Em termos de composição de proteínas da membrana externa de células na fase exponencial, estacionária e de declínio não há grandes diferenças, a não ser na concentração de certas bandas proteicas (Figura 3.8). Portanto, a diminuição da eficiência de infecção fágica quando as células se encontram na fase estacionária e de declínio é provavelmente devido à qualidade do hospedeiro e não à presença de receptores na parede celular.

A infecção fágica pode ser influenciada quando as condições de crescimento não são favoráveis. Certas características na composição do meio tais como a força iónica (Thompson e Yates, 1999; Williams e Berg, 1992) e o pH (Babish e Stotsky, 1980; Corapcioglu e Shiyan, 1993; Rossi e Aragno, 1999) podem ser determinantes no



desempenho do fago. A infecção de células crescidas em MG foi ineficaz (Tabela 3.6). Uma das possíveis razões para este facto pode ser a ausência de receptores na parede celular (Figura 3.9), uma vez que as bandas proteicas de  $17.5 \pm 1$  kDa e de  $99 \pm 5$  kDa, identificadas como prováveis receptores celulares, não se encontram presentes nestas células.

### 3.4. BIBLIOGRAFIA

- Ashelford K E, Day M J, Fry J C (2003) *Elevated Abundance of Bacteriophage Infecting Bacteria in Soil*. Appl Environm Microbiol. **69**:285-289
- Babish H, Stotsky G (1980) *Reductions in rates of bacteriophages by clay minerals in lake water*. Water Res **14**:185-187.
- Corapcioglu M Y, Shiyan J (1993) *Colloid-facilitated ground-water contaminant transport*. Water Resour Res **29**:2215-2226.
- Cousin M A (1982) *Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review*. J Food Prot **45**:172-207.
- Donachie W D, Robinson A C (1987) *Cell division: parameter values and the process*, p. 1578-1593. In F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*, vol. 2. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Guillou C, Guespin-Michel J F (1995) *Evidence of two domains of growth temperature for the psychrotrophic bacterium Pseudomonas fluorescens MF0*. Appl Environm Microbiol **62**:3319-3324.
- Guillou C, Merieu A, Trebert B, Guespin-Michel J F (1995) *Growth temperature is involved in the regulation of extracellular lipase at two different levels in Pseudomonas fluorescens strain MF0*. Biotechnol Lett **17**:377-382.
- Hadas H, Einav M, Fishov I, Zaritsky. 1997. *Bacteriophage T4 development depends on the physiology of its host Escherichia coli*. Microbiology **254**:179-185.
- Ingraham J L, Maaløe O, Neidhardt F C (1983) *Growth rate as a variable*. In *Growth of the bacterial cell*, pp. 267-315. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Kjelleberg S, Hermansson M, Marden P, Jones G W (1987) *The transient phase between growth and nongrowth of heterotrophic bacteria, with emphasis on the marine environment*. Annu Rev Microbiol **41**:25-49.

- Laemmli U K (1970) *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature **227**:680-685.
- Masuda N, Sakagawa E, Ohya S (1995) *Outer membrane proteins responsible for multiple drug resistance in Pseudomonas aeruginosa*. Antim Agents Chemother **39**:645-649.
- Propst-Ricciuti C (1972) *Host-virus interactions in Escherichia coli: effects of stationary phase on viral release from MS2-infected bacteria*. J Virol **10**:162-165.
- Propst-Ricciuti C (1976) *The effect of host-cell starvation on virus-induced lysis by MS2 bacteriophage*. J Gen Virol **31**:323-330.
- Rossi P, Aragno M (1999) *Analysis of bacteriophage inactivation and its attenuation by adsorption onto colloidal particles by batch agitation techniques*. Can J Microbiol **45**:9-17.
- Shah N P (1994) *Psychrotrophs in milk: a review*. Milchwissenschaft. **49**:432-437.
- Swart G J, Jooste P J, Mostert J F (1990) *Species identification and some physiological characteristics of Gram-negative psychrotrophic isolates from raw silo milk*. S Afr Dairy **22**:31-36.
- Thompson S S, Yates M V (1999) *Bacteriophage inactivation at the air-water-solid interface in dynamic batch systems*. Appl Environ Microbiol **65**:1186-1190.
- Williams D F, Berg J C (1992) *The aggregation of colloidal particles at the air-water interface*. J Colloid Interface Sci **152**:218-229.
- Young R, Wang I-N, Roof W D (2000) *Phages will out: strategies of host cell lysis*. Trends Microbiol. **8**:120-128.

## CAPÍTULO 4 - INFECCÃO FÁGICA DE BIOFILMES

Os biofilmes têm um impacto negativo na indústria, principalmente na indústria alimentar, podendo ser responsáveis pela perda de qualidade dos produtos. Segundo alguns autores a estrutura do biofilme e as características fisiológicas das células conferem aos biofilmes resistência a biocidas dificultando por esse motivo a sua erradicação (Donlan e Costerton, 2002; Gilbert *et al.*, 1997). Certos mecanismos tais como: (i) a penetração limitada dos agentes químicos através da estrutura do biofilme; (ii) a reacção dos biocidas com componentes da matriz (Simões *et al.*, 2003); (iii) as diferentes taxas de crescimento dos organismos do biofilme e (iv) outras alterações fisiológicas inerentes ao modo de crescimento do biofilme (Donlan e Costerton, 2002) têm sido descritos como factores que podem ser responsáveis pela resistência dos biofilmes aos biocidas. Por outro lado, são necessárias concentrações elevadas de biocidas para erradicar os biofilmes industriais, o que conduz a um impacto ambiental muito negativo. É portanto fundamental desenvolver novos meios para eliminar os biofilmes de instalações industriais.

A utilização fagos líticos pode ser uma boa alternativa para o controlo de biofilmes. Os fagos são extremamente específicos, afectando apenas as espécies bacterianas hospedeiras e assim não interferem com a comunidade microbiana autóctone. Esta especificidade é bastante vantajosa por exemplo na indústria de lacticínios em que a presença de certas bactérias (ex.: *Lactobacillus sp.*) é indispensável para o processamento dos produtos alimentares e por esse motivo não devem ser eliminadas. Acresce ainda que os fagos não são tóxicos para os humanos, animais e plantas, conseguem ser eficientes no combate de bactérias resistentes a biocidas e a sua produção é relativamente simples e económica. Embora a utilização de fagos em

bactérias resistentes a antibióticos em áreas como a veterinária e medicina tenha já sido descrita (Sulakvelidze *et al.*, 2001; Barrow, 2001), existem apenas alguns estudos sobre interações de fagos com biofilmes (Corbin *et al.*, 2001; Hanlon *et al.*, 2001; Hughes *et al.*, 1998; Tait *et al.*, 2002). Esses estudos demonstraram que os fagos conseguem perfeitamente infectar biofilmes bacterianos. Segundo Wiggins e Alexander (1985) a replicação do fago pode até ser favorecida em biofilmes, uma vez que as células se encontram mais próximas umas das outras comparativamente com células em suspensão.

Quase todos os trabalhos publicados sobre fagos referem-se a estudos realizados com suspensões bacterianas e aplicados a diferentes meios tais como: ambientes aquáticos (Wommack e Colwell, 2000; Fuhrman e Suttle, 1993); tratamentos de águas residuais (Muniesa e Jofre, 1998; Mocé-Llivina *et al.*, 2003) e em instalações industriais (Brüssow *et al.*, 1994; Kiliç *et al.*, 1996), existem apenas alguns estudos relativamente à infecção fágica de biofilmes. É sabido que nesses ambientes o crescimento bacteriano está muitas vezes associado a biofilmes e como as células nos biofilmes apresentam fisiologia diferente das crescidas em suspensão não se pode extrapolar os resultados obtidos com suspensões bacterianas para o biofilme. Nos biofilmes as bactérias encontram-se embebidas numa matriz polimérica. Por outro lado, as células bacterianas não se encontram distribuídas uniformemente mas sim agregadas em microcolónias (Lawrence *et al.*, 1991; Sternberg *et al.*, 1999). A taxa de crescimento no interior das microcolónias é menor devido ao acesso limitado às bactérias de nutrientes e oxigénio (Anwar *et al.*, 1992; Costerton *et al.*, 1987; Fletcher, 1991), encontrando-se as células metabolicamente mais activas na periferia de cada microcolónia (Sternberg *et al.*, 1999; Azeredo e Oliveira, 2000).

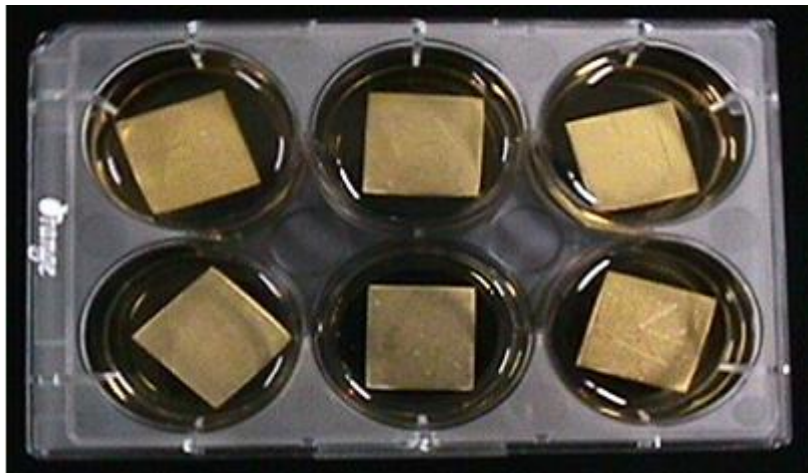
Neste estudo determinou-se a capacidade do fago lítico  $\Phi$  S1 no controlo de biofilmes de *Pseudomonas fluorescens*. Esta bactéria é especialmente problemática na indústria de lacticínios uma vez que é responsável pela perda de qualidade do leite devido à produção de enzimas proteolíticas. Para além disso os biofilmes formados por *P. fluorescens* são difíceis de erradicar através da utilização de biocidas químicos (Simões *et al.*, 2003). Este estudo baseou-se na determinação dos efeitos da idade do

biofilme, da temperatura de infecção fágica e da temperatura de crescimento do hospedeiro no desempenho do fago.

## 4.1. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1.1 Formação de Biofilme

Cresceram-se culturas de *P. fluorescens* em meio MCN durante 24 horas às temperaturas de 4°C, 26°C e 37°C até atingiram a fase exponencial de crescimento. As células foram, posteriormente, centrifugadas (7,000×g, 4°C, 10 minutos) e o *pellet* foi ressuspenso em meio MCN de modo a se ter uma D.O. a 640nm de aproximadamente 0.75. Colocaram-se 9ml de suspensão de *P. fluorescens* em cada poço de uma microplaca de 6 poços contendo placas de aço inox 2×2cm<sup>2</sup>. A microplaca foi incubada à temperatura desejada (4°C, 26°C e 37°C) sob agitação (100rpm) durante 5 e 13 dias com mudança de meio de 12 em 12 horas.



**Figura 4.1** – Formação de biofilme em microplacas de 6 poços.

Formaram-se também biofilmes em condições estáticas, ou seja, sem agitação, durante 5 dias fazendo-se a mudança de meio de 12 em 12 horas.

Após a formação dos biofilmes, os poços contendo placas de aço inox foram lavados com meio MCN e o biofilme foi raspado para *Erlenmeyers* com a ajuda de uma espátula ou uma lâmina.

### 4.1.2 Determinação do Número de Células dos Biofilmes

Para a determinação do número de células existente em biofilmes 0.5g (peso húmido) de biofilme foram submetidos a um processo de extracção de polissacáridos descrito por Azeredo *et al.* (2003) utilizando resina Dowex de modo a separar a matriz das células. O peso seco foi determinado após 24h a 105°C. O número de células correspondente foi obtido através de uma curva de calibração entre o peso seco e o número de células. A contagem do número de células foi realizado utilizando, para tal, uma câmara de Neubauer. O peso seco de 0.5g (peso húmido) de biofilme corresponde a  $1.54 \times 10^{11} \pm 0.20 \times 10^{11}$  células.

### 4.1.3 Infecção Fágica de Biofilmes

#### Efeito da Idade do Biofilme

Formaram-se biofilmes de *P. fluorescens*, tal como descrito em 4.1.1, a 26°C e em condições dinâmicas durante 5 e 13 dias. Os ensaios foram realizados em *Erlenmeyers* aos quais se adicionaram 16ml de meio MCN, 0.5g (peso húmido) de biofilme raspado e 8ml de solução fágica ( $9.0 \times 10^9$  PFU/ml) de modo a se ter uma multiplicidade de infecção de aproximadamente 0.5. Para além de *Erlenmeyers* para o estudo da infecção fágica foram realizados ensaios sem a presença de fago – os controlos. Nos controlos utilizaram-se 3 volumes de meio MCN e 0.5g (peso húmido) de biofilme raspado. Os *Erlenmeyers* foram incubados a três temperaturas de infecção – 4°C, 26°C e 37°C e a 130rpm. Retiraram-se, periodicamente, amostras para medição da quantidade de ATP de acordo com o procedimento descrito em 2.1.3.

#### Efeito das Condições (estática/dinâmica) de Formação e Infecção de Biofilmes

Formaram-se biofilmes de *P. fluorescens*, tal como descrito em 4.1.1, a 26°C e em condições estáticas e dinâmicas durante 5 dias. A infecção fágica foi realizada tal como descrito anteriormente com medição, ao longo do tempo, da quantidade de ATP (descrito em 2.1.3).



### **Efeito da Temperatura de Infecção**

Formaram-se biofilmes de *P. fluorescens*, tal como descrito em 4.1.1, a 26°C e em condições dinâmicas. Os ensaios foram realizados tal como descrito previamente. Os *Erlenmeyers* foram incubados a três temperaturas de infecção – 4°C, 26°C e 37°C e a 130rpm. Retiraram-se, periodicamente, amostras para medição da quantidade de ATP (descrito em 2.1.3) e para determinação do título do fago (descrito em 2.1.4).

### **Efeito da Temperatura de Crescimento**

O protocolo é semelhante ao anteriormente descrito no entanto, os biofilmes de *P. fluorescens* foram formados a três temperaturas diferentes (4°C, 26°C e 37°C) e a infecção fágica foi efectuada a 26°C.

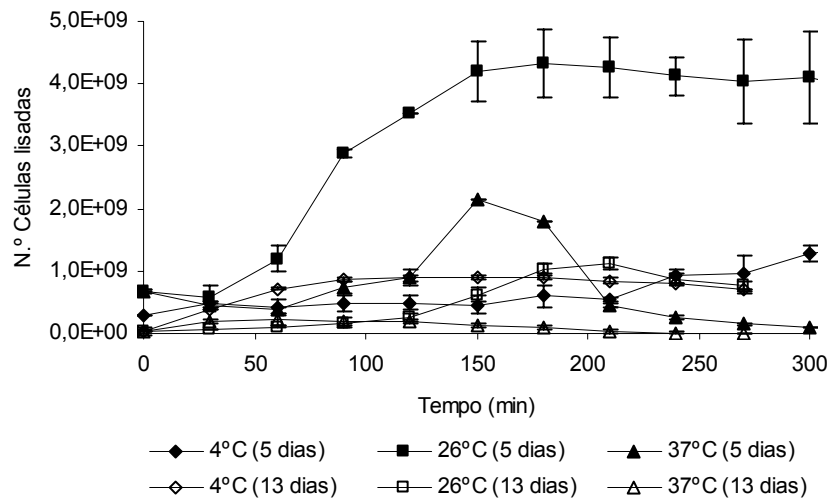
### **4.1.4 Análise Estatística**

Para comparar as taxas de lise celular e de libertação de fagos utilizou-se o método estatístico “*one-way analysis of variance*” (One-way ANOVA) seguido de testes *post hoc* utilizando o teste de Tukey. Em todas as análises realizadas o intervalo de confiança utilizado foi de 95%. Estes testes foram realizados utilizando o programa SPSS (versão 11.5) para Windows.

## 4.2. RESULTADOS

### 4.2.1 Infecção de Biofilmes Crescidos Durante 5 e 13 Dias

Nestes ensaios compararam-se os perfis de infecção fágica de biofilmes de idades diferentes de modo a verificar se a idade do biofilme influencia a actuação do fago. A Figura 4.2 mostra a quantidade de células lisadas após infecção de biofilmes, formados em condições dinâmicas, durante 5 e 13 dias a 4°C, 26°C e a 37°C.



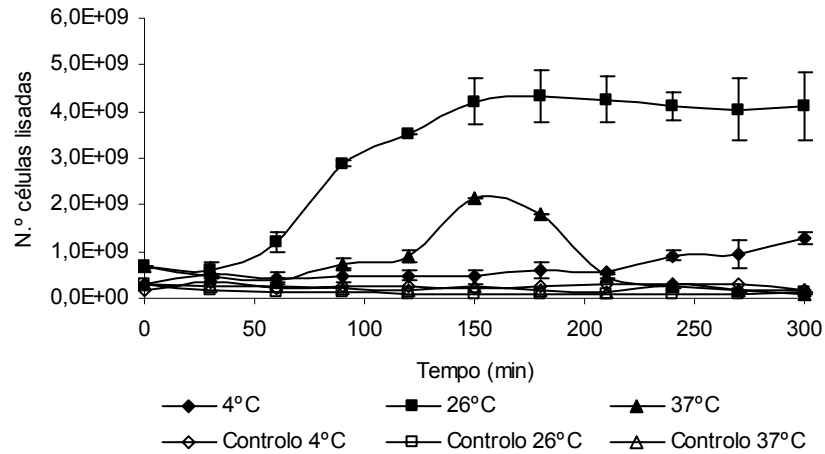
**Figura 4.2** – Número de células lisadas em biofilmes de *P. fluorescens* formados e infectados a 4°C, 26°C e a 37°C.

A infecção de biofilmes formados durante 5 dias foi bastante mais eficaz do que a infecção de biofilmes mais velhos, uma vez que a lise celular foi menor (Figura 4.2).

### 4.2.2 Biofilmes Formados e Infectados em Condições Estáticas e Dinâmicas

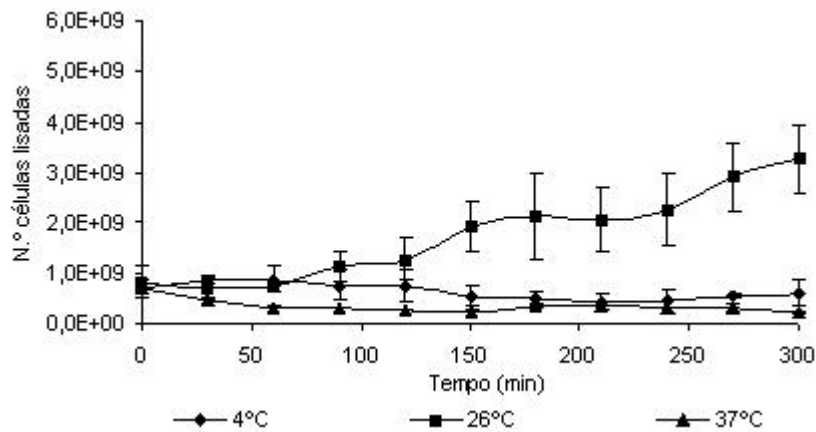
Nestes ensaios formaram-se biofilmes de *P. fluorescens* durante 5 dias em condições estáticas e dinâmicas. Posteriormente esses biofilmes foram infectados com fago também nas mesmas condições, ou seja sem e com agitação. Nas Figura 4.3 e 4.4

apresentam-se o número de células lisadas após infecção fágica de biofilmes formados em condições dinâmicas e estáticas. Também se apresentam os resultados obtidos com os controlos, ou seja amostras que não foram incubadas com fago.



**Figura 4.3** – Número de células lisadas em biofilmes de *P. fluorescens* formados e infectados em condições dinâmicas.

Como se pode verificar ocorre uma maior lise em biofilmes formados e infectados a 26°C (Figura 4.3).



**Figura 4.4** – Número de células lisadas em biofilmes de *P. fluorescens* formados e infectados em condições estáticas.

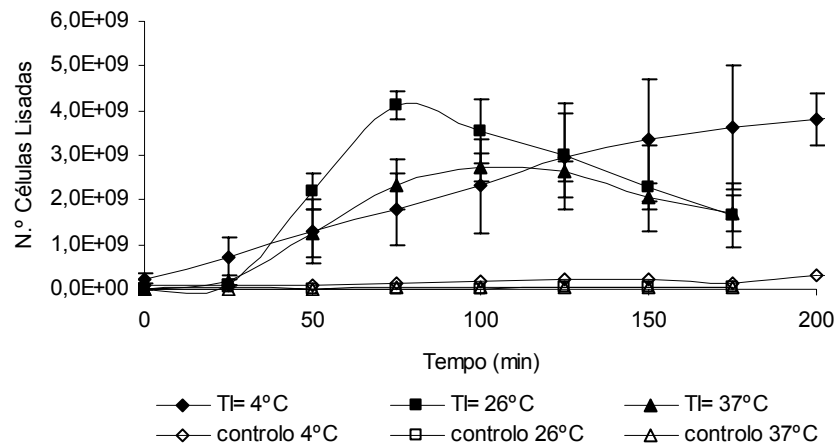
Na Figura 4.4 não se colocaram os resultados referentes aos controlos, pois dificultavam a observação do que se sucedia com os biofilmes formados a 4°C e a 37°C.

No entanto, a extensão de lise celular ocorrida nos controlos foi semelhante à obtida no ensaio apresentado na Figura 4.3.

Como se verifica pela análise das Figuras 4.3 e 4.4, o fago actua de modo diferentes sobre os biofilmes formados e infectados em condições estáticas e dinâmicas, sendo o número de células lisadas superior quando a forma de formação e infecção de biofilmes ocorre em condições dinâmicas. Os biofilmes crescidos a 26°C, tanto em condições estáticas como em condições dinâmicas, sofreram uma maior lise celular. A infecção de biofilmes formados a 4°C e a 37°C em condições estáticas foi pouco eficaz.

### 4.2.3 Efeito da Temperatura de Infecção

O estudo do efeito da temperatura de infecção foi realizado com biofilmes de *P. fluorescens* formados a 26°C e infectados a 4°C, 26°C e a 37°C. A Figura 4.5 mostra os resultados, em termos de células lisadas, obtidos às diferentes temperaturas de infecção.



**Figura 4.5** – Número de células lisadas em biofilmes de *P. fluorescens* formados a 26°C e infectados a 4°C, 26°C e a 37°C.

A infecção de biofilmes formados a 26°C mostrou diferenças quando a infecção decorreu às diferentes temperaturas. A infecção a 26°C mostrou ser a temperatura de infecção mais eficaz, tendo-se obtido um número máximo de células lisadas após 75 minutos de infecção. Na Tabela 4.1 encontram-se os parâmetros de infecção obtidos após infecção de biofilmes formados a 26°C e infectados às diferentes temperaturas testadas.

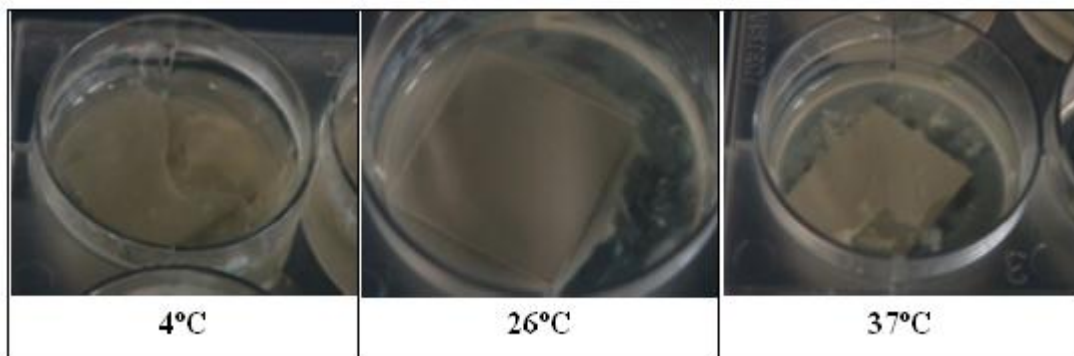
**Tabela 4.1** – Parâmetros de infecção obtidos após infecção fágica de biofilmes de *P. fluorescens* a diferentes temperaturas ( $T_I$ ).

$T_I$ (°C)	$k$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$\text{PFU}_{\text{MAX}} \times 10^{-10}$ ( $\text{PFU ml}^{-1}$ )	$\text{PFU}/t \times 10^{-8}$ ( $\text{PFU ml}^{-1} \text{min}^{-1}$ )
4	$0.010 \pm 0.001$	$3.74 \pm 0.28$	$3.48 \pm 0.12$
26	$0.021 \pm 0.002$	$1.28 \pm 0.74$	$4.60 \pm 2.87$
37	$0.015 \pm 0.001$	$0.15 \pm 0.61$	$0.49 \pm 0.23$

O significado dos parâmetros apresentados na Tabela 4.1 encontra-se descrito no capítulo 3 item 3.2.2. A temperatura de infecção ótima de biofilmes foi 26°C. A esta temperatura obtiveram-se os valores máximos quer de taxa de lise celular ( $k$ ) sendo estatisticamente diferentes da infecção de células a 4°C ( $p < 0.05$ ). A taxa de libertação de fagos (PFU/t) foi 1.32 vezes superior em biofilmes quando infectados a 26°C comparativamente com a infecção de biofilmes a 4°C.

#### 4.2.4 Efeito da Temperatura de Crescimento

Na Figura 4.6 encontram-se imagens de biofilmes formados a 4°C, 26°C e a 37°C.

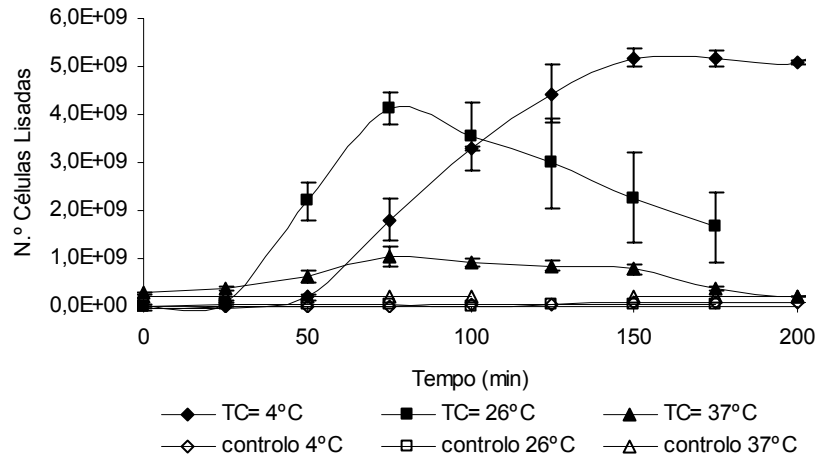


**Figura 4.6** – Biofilmes de *P. fluorescens* formados a 4°C, 26°C e a 37°C.

Como se pode verificar pela observação das imagens da Figura 4.6, os biofilmes formados a diferentes temperaturas tem características distintas. Biofilmes crescidos a 4°C têm tendência a se formarem na interface ar/líquido, os biofilmes formados a 26°C

apresentam-se bastante viscosos e os biofilmes formados a 37°C destacam-se facilmente.

Na Figura 4.7 mostram-se os resultados, em termos de número de células lisadas, após infecção fágica a 26°C de biofilmes formados a 4°C, 26°C e 37°C.



**Figura 4.7** – Número de células lisadas em biofilmes de *P. fluorescens* formados a 4°C, 26°C e a 37°C e infectados 26°C.

A infecção de biofilmes formados tanto a 4°C como a 26°C foi bastante eficaz. A infecção de biofilmes formados a 4°C resultou num maior número de células lisadas, no entanto o valor máximo foi obtido após 150 minutos de infecção, enquanto que com biofilmes formados a 26°C o máximo foi obtido após 75 minutos de ensaio.

Na Tabela 4.2 encontram-se os parâmetros de infecção obtidos após infecção fágica a 26°C de biofilmes formados a 4°C, 26°C e 37°C.

**Tabela 4.2** – Parâmetros de infecção obtidos após infecção fágica a 26°C de biofilmes de *P. fluorescens* formados a diferentes temperaturas ( $T_C$ ).

$T_C$ (°C)	$k$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$\text{PFU}_{\text{MAX}} \times 10^{-10}$ ( $\text{PFU ml}^{-1}$ )	$\text{PFU}/t \times 10^{-8}$ ( $\text{PFU ml}^{-1} \text{min}^{-1}$ )
4	$0.016 \pm 0.001$	$3.42 \pm 0.03$	$2.17 \pm 0.04$
26	$0.021 \pm 0.002$	$1.28 \pm 0.74$	$4.60 \pm 2.87$
37	$0.011 \pm 0.001$	$0.15 \pm 0.21$	$0.11 \pm 0.02$

A eficiência de infecção dos biofilmes formados a 26°C foi superior e estatisticamente diferente ( $p < 0.05$ ) da infecção de biofilmes formados a 4°C e a 37°C. A esta temperatura de crescimento a taxa de lise celular foi superior, bem como a taxa de libertação de fagos do que a infecção de células crescidas a 4°C. A infecção a 26°C de biofilmes formados a 37°C foi a menos eficaz.

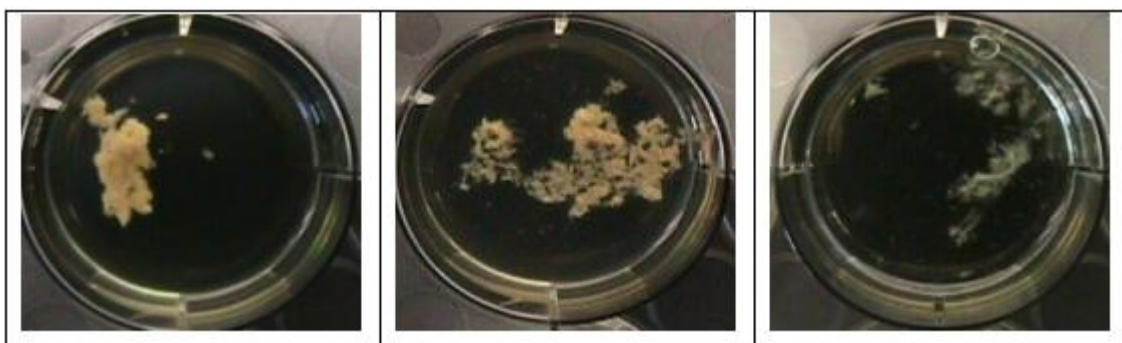
Na Tabela 4.3 encontram-se os valores de redução de biomassa obtidos após infecção fágica de suspensões e biofilmes a 26°C.

**Tabela 4.3** – Redução de biomassa após infecção fágica durante 200 minutos de biofilmes e culturas de *P. fluorescens* crescidas a 26°C.

Redução de biomassa (%)	
Suspensão celular	Biofilmes
86.27 ± 0.88	84.27 ± 0.42

Como se pode verificar através da Tabela 4.3 a redução de biomassa em ensaios realizados com biofilmes e com suspensões de *P. fluorescens* foi aproximadamente a mesma após um período de infecção de 200 minutos.

Na Figura 4.8 encontram-se algumas imagens do decurso de infecção a 26°C de também a 26°C.



**Figura 4.8** – Infecção a 26°C de biofilmes de *P. fluorescens* formados a 26°C. (1- 0 minutos, 2 – 90 minutos, 3 – 200 minutos).

Como se pode verificar, tanto a matriz polimérica como as células são destruídas pelo fago.

### 4.3. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O estudo realizado permitiu verificar que a infecção de biofilmes jovens é muito mais eficaz do que a infecção de biofilmes velhos. Este facto poderá estar relacionado com as diferenças dos estados metabólicos das células dos biofilmes formados durante 5 e 13 dias. A actividade metabólica e respiratória de biofilmes jovens é superior à de biofilmes mais velhos (Zang, 1995). O processo de infecção fágica depende dos recursos intracelulares dos hospedeiros, o que depende ainda do estado fisiológico das bactérias hospedeiras (Hadas *et al*, 1997). Verificou-se, no trabalho descrito no capítulo 3, que a infecção fágica era menos eficiente nas células em fase de declínio do que em células na fase exponencial. Portanto, sendo o biofilme mais velho constituído por um grande número de células já na fase de declínio, seria de esperar uma infecção de biofilmes de 5 dias superior a uma infecção de biofilmes formados durante 13 dias, tal como se verificou (Figura 4.2). Por outro lado, de uma maneira geral, os biofilmes mais velhos apresentam uma maior quantidade de matriz polimérica (Lazarova e Manem, 1995). Este facto poderá também ter contribuído para a baixa taxa de lise celular uma vez que a difusão do fago através de uma matriz espessa é dificultado (Hanlon *et al.*, 2001).

O modo de infecção fágico, estático ou dinâmico, de biofilmes influencia o processo de lise celular. A infecção de biofilmes sob condições dinâmicas mostrou ser mais eficiente do que a infecção em condições estáticas. Provavelmente a agitação faz com que o fago encontre mais rapidamente as células do biofilme e desse modo inicie a infecção também mais rapidamente (Figura 4.3 e Figura 4.4).

Verificou-se, no trabalho descrito no Capítulo 3, que a temperatura óptima de crescimento bem como a temperatura óptima de infecção de células planctónicas era de 26°C. No caso do biofilme, também a temperatura óptima foi de 26°C (Figura 4.5 e Tabela 4.1). O estudo do efeito da temperatura de crescimento do biofilme e infecção é particularmente útil caso se pretenda utilizar os fagos no controlo de biofilmes industriais, uma vez que, na indústria os biofilmes são formados às temperaturas do



processo. No caso particular da indústria de laticínios podem ser encontradas no processo temperaturas de 37°C, na zona da ordenha, bem como de 4°C nos tanques de refrigeração. A infecção fágica de biofilmes a 4°C e a 37°C foi pouco eficaz. Este facto sugere que a infecção a temperaturas abaixo e acima da temperatura óptima afectam a replicação do fago, provavelmente devido à inibição do sistema de síntese de proteínas das células hospedeiras (Hadas *et al.*, 1997). Também em biofilmes formados a 37°C e 4°C verificou-se uma ineficiente actuação do fago. Pode concluir-se que a libertação de fagos é também dependente da temperatura de crescimento do biofilme (Tabela 4.2). Este facto pode ser relacionado com as alterações fisiológicas que ocorrem em células de *P. fluorescens* quando crescidas a temperaturas diferentes da óptima. As alterações reflectem-se nas concentrações de ADN, proteínas, ARN e mesmo no tamanho das células (Guillou e Guespin-Michel, 1996; You *et al.* 2002; Araki, 1991, Hadas *et al.*, 1997). Por outro lado, verificou-se no trabalho descrito no capítulo 3 que a composição das PME das células crescidas a 4°C e a 37°C eram diferentes das PME das células crescidas a 26°C, o que parecia indicar que a 4°C e a 37°C os receptores de superfície não eram expressos.

De acordo com os resultados obtidos e descritos no capítulo 3 sobre o efeito da infecção fágica de células em diferentes fases de crescimento a libertação de fagos é superior em células na fase exponencial do que em células nas fases estacionária e de declínio. A taxa de produção de fagos em culturas de células suspensas crescidas e infectadas a 26°C foi de  $16.90 \times 10^8$  PFU/ml/min, enquanto que com biofilmes se obteve apenas  $4.29 \times 10^8$  PFU/ml/min. Esta diferença pode ser devida à presença nos biofilmes de células em diferentes fases de crescimento. Outra possível explicação pode ser o acesso mais dificultado do fago às bactérias devido à estrutura do biofilme (Hanlon *et al.*, 2001).

Uma das grandes desvantagens do uso de fagos como agentes controladores de bactérias é o aparecimento de bactérias resistentes a fagos. Este fenómeno foi relatado em alguns trabalhos de terapia fágica (Berkowitz, 1995; Tenover e Hughes, 1996). Neste estudo, o crescimento de *P. fluorescens* reapareceu aproximadamente após 10 horas de infecção fágica. Para verificar se estas células se tinham tornado resistentes ao

fago, foram sujeitas a uma nova infecção mas com fago fresco. Como ocorreu lise celular, pôde concluir-se que não adquiriram resistência.

Em ambientes industriais a eliminação e inactivação de microrganismos das superfícies é crucial. Quando a desinfecção ocorre sem a devida remoção do biofilme, estes biofilmes inactivados podem propiciar um ambiente ideal para a adesão e crescimento de bactérias (Simões *et al.*, 2003). Em estudos de caracterização da actuação de biocidas químicos em biofilmes de *P. fluorescens* verificou-se que a inactivação e remoção de biofilmes de superfícies com estes agentes foi bastante fraca (menor que 25%). Por outro lado, após 30 minutos de tratamento com estes biocidas não se tinha observado uma destruição da estrutura do biofilme (Simões *et al.*, 2003). No presente estudo, a redução de biomassa obtida após infecção durante 200 minutos de células suspensas e biofilmes foi aproximadamente igual (85%) (Tabela 4.3). Este facto indica que a eficiência de infecção do fago  $\Phi$ S1 não é afectado pelo modo de vida sésil da *P. fluorescens*. A infecção de biofilmes a 26°C mostrou que o fago conseguiu destruir tanto a matriz como as células (Figura 4.8). A hidrólise da matriz pode ser devido à presença de enzimas intracelulares induzidas pelo fago. De acordo com alguns autores, essas enzimas são essenciais num processo de infecção fágica, uma vez que são responsáveis pela abertura de caminhos na matriz polimérica conseguindo assim o fago aceder às bactérias existentes no interior dos biofilmes (Hughes *et al.*, 1998; Sutherland, 1999).

Este estudo mostrou que a 26°C a utilização de fagos na eliminação dos biofilmes é mais eficiente do que a utilização dos tradicionais biocidas químicos, uma vez que causa uma maior redução de biomassa total, provocando a destruição da matriz bem como a ruptura das células do biofilme. No entanto, a eficiência do fago é dependente tanto da temperatura de infecção fágica como da temperatura de crescimento do hospedeiro, portanto a utilização deste fago é limitada às condições óptimas.

#### 4.4. BIBLIOGRAFIA

- Anwar H, Strap J L, Costerton J W (1992) *Establishment of aging biofilms: possible mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial therapy*. Antimicrob Agents Chemother **36**: 1347-1351.
- Araki T (1991) *Changes in rates of synthesis of individual proteins in a psychrophilic bacterium after a shift of temperature*. Can J Microbiol **37**:840-847.
- Azeredo J, Henriques M, Sillankorva S, Oliveira R (2003) *Extraction of Exopolymers from Biofilms: the Protective Effect of Glutaraldehyde*, Water Science & Technology **47**:5, 175–179.
- Azeredo J, Oliveira R (2000) *The role of exopolymers produced by Sphingomonas paucimobilis in biofilm formation and composition*, Biofouling **16**:17-27.
- Barrow P (2001) *The use of bacteriophages for treatment and prevention of bacterial disease in animals and animal models of human infection*. J Chem Technol Biotechnol **76**, 677-682.
- Berkowitz F E (1995) *Antibiotic resistance in bacteria*. South Med J **88**:797-804.
- Brüssow H, Frémont M, Bruttin A, Sidoti J, Constable A. (1994) *Detection and classification of Streptococcus thermophilus bacteriophages isolated from industrial milk fermentation*. Appl Environ Microbiol **39**:213-222.
- Corbin B D, McLean R J C, Aron G M (2001) *Bacteriophage T4 multiplication in a glucose-limited Escherichia coli biofilm*. Can J Microbiol **47**:680-684.
- Costerton J W, Cheng K-J, Geesey G G, Ladd T I, Nickel J C, Dasgupta M, Marrie T J (1987) *Bacterial biofilms in nature and disease*. Annu Rev Microbiol **41**:435-464.
- Donlan M R, Costerton J W (2002) *Biofilm: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms*. Clin Microb Rev **15**:167-193.
- Fletcher M (1991) *The physiological activity of bacteria attached to solid surfaces*. Adv Microb Physiol **32**:53-85.
- Fuhrman J A, Suttle C A (1993) *Viruses in marine planktonic systems*. Oceanography **6**:50-62.

- Gilbert P, Das J, Foley I (1997) *Biofilm susceptibility to antimicrobials*. *Adv Dent Res* **11**:160-167.
- Guillou C, Guespin-Michel J F (1996) *Evidence for two domains of growth temperature for the psychrotrophic bacterium Pseudomonas fluorescens MF0*. *Appl Environm Microbiol* **62**:2219-3324.
- Hadas H, Einav M, Fishov I, Zaritsky (1997) *Bacteriophage T4 development depends on the physiology of its host Escherichia coli*. *Microbiology* **254**:179-185.
- Hanlon G W, Denyer S P, Olliff C J, Ibrahim L J (2001) *Reduction in exopolysaccharide viscosity as an aid to bacteriophage penetration through Pseudomonas aeruginosa biofilms*. *Appl Environm Microbiol* **67**:2746-2753.
- Hughes K A, Sutherland I W, Clark J, Jones M V (1998) *Bacteriophage and associated polysaccharide depolymerases – novel tools for study of bacterial biofilms*. *J Appl Microbiol* **85**:583-590.
- Kiliç A O, Pavlova S I, Ma W-G, Tao L (1996) *Analysis of Lactobacillus phages and bacteriocins in American dairy products and characterization of a phage isolated from yogurt*. *Appl Env Microbiol* **62**:2111-2116.
- Lawrence J R, Korber D R, Hoyle B D, Costerton J W, Caldwell D E (1991) *Optical sectioning of microbial biofilms*. *J Bacteriol* **173**:6558-6567.
- Lazarova V, Manem J (1995) *Biofilm characterization and activity analysis in water and waste water treatment*. *Water Res.* **29**:2227-2245.
- Mocé-Llivina L, Muniesa M, Pimenta-Vale H, Lucena F, Jofre J (2003) *Survival of bacterial indicator species and bacteriophages after thermal treatment of sludge and sewage*. *Appl Env Microbiol* **69**:1452-1456.
- Muniesa M, Jofre J (1998) *Abundance in sewage of bacteriophages that infect Escherichia coli O157:H7 and that carry the Shiga Toxin 2 gene*. *Appl Environm Microbiol* **64**:2443-2448.
- Simões M, Carvalho H, Pereira M O, Vieira M J (2003) *Studies on the behaviour of Pseudomonas fluorescens biofilms after ortho-phthaldehyde treatment*. *Biofouling* **19**:3,151-157.

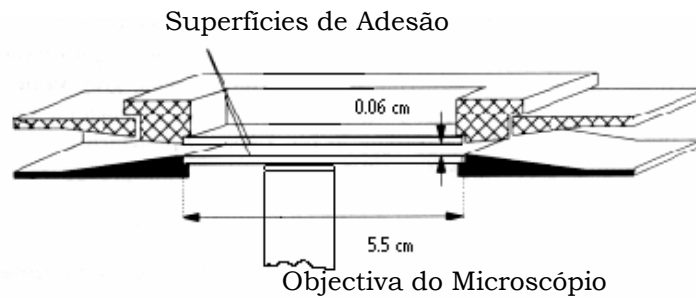
- Sternberg C, Christenses B B, Johanse T, Nielsen A T, Andersen J B, Givskov M, Molin S (1999) *Distribution of bacterial growth activity in flow-chamber biofilms*. Appl Environ Microbiol **65**: 4108-4117.
- Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris J G (2001) *Bacteriophage therapy*. Antimicrob Agents Chemotherapy **45**:649-659.
- Sutherland I W (1999) *Polysaccharases for microbial exopolysaccharides*. Carbohydr Polymers **38**:319-328.
- Tait K, Skillman L C, Sutherland I W (2002) *The efficacy of bacteriophage as a method of biofilm eradication*. Biofouling **18**:305-311.
- Tenover F C, Hughes J M (1996) *The challenges of emerging infectious diseases: development and spread of multiply-resistant bacterial pathogens*. JAMA. **275**:300-304.
- Wiggins B A, Alexander M (1985) *Minimum bacterial density for bacteriophage replication: implications for significance of bacteriophages in natural ecosystems*. Appl Environ Microbiol **49**:19-23.
- Wommack K E, Coldwell R R (2000) *Virioplankton: Viruses in Aquatic Ecosystems*. Microbiol Molec Biol Rev. **64**:69-114.
- Woody M A, Cliver D O (1995) *Effects of temperature and host cell growth phase on replication of F-specific RNA Coliphage Q $\beta$* . Appl Environm Microbiol **61**:1520-1526.
- You L, Suthers P F, Yin J (2002) *Effects of Escherichia coli physiology on growth of phage T7 in vivo and in silico*. J Bacteriol **184**:1888-1894.

## CAPÍTULO 5 - INFECÇÃO FÁGICA DE CÉLULAS ADERIDAS

A adesão de microrganismos a superfícies tem consequências negativas na saúde (Bussher *et al.*, 1997; Schulze *et al.*, 1989), na indústria (Flint *et al.*, 1997; Notermans *et al.*, 1991) bem como no ambiente (Percival *et al.*, 1999) e o processo é precedido da formação de biofilmes. Estes biofilmes podem causar inúmeros problemas tais como a diminuição da transferência de calor em permutadores de calor, aumento da corrosão e contaminação de produtos (Zottola e Sashara, 1994). O efeito mais negativo de formação de biofilmes é observado na área da medicina onde o elevado número de infecções associadas ao uso de implantes é devido à adesão microbiana à superfície desses implantes. (Goméz-Suárez *et al.*, 2001). O aparecimento de bactérias resistentes a biocidas e a fraca remoção de células por parte destes agentes tem aumentado o interesse na utilização de agentes biológicos, tais como os fagos. Verificou-se no trabalho experimental descrito no Capítulo 4 que o fago lítico  $\Phi$  S1 é bastante eficaz na destruição de biofilmes de *Pseudomonas fluorescens*. Sendo a adesão microbiana o passo inicial de formação de biofilmes, pretende-se avaliar se este fago é também capaz de erradicar células aderidas e assim prevenir a formação de biofilmes.

A adesão de microrganismos a superfícies e a sua remoção dessas superfícies é difícil de avaliar e existem vários sistemas estáticos e dinâmicos desenvolvidos para auxiliar estes estudos (Kojima *et al.*, 1992; Rijnaarts *et al.*, 1993). É bastante comum utilizarem-se células de fluxo uma vez que estas permitem o controlo das condições hidrodinâmicas e a monitorização, *in situ* e em tempo real, do número de células aderidas ao longo do tempo, bem como do número de células removidas por agentes químicos (Azeredo *et al.*, 2003).

Neste estudo utilizou-se uma célula de fluxo paralelo (regime laminar) desenvolvida por Sjollema *et al* em 1989 (Figura 5.1).



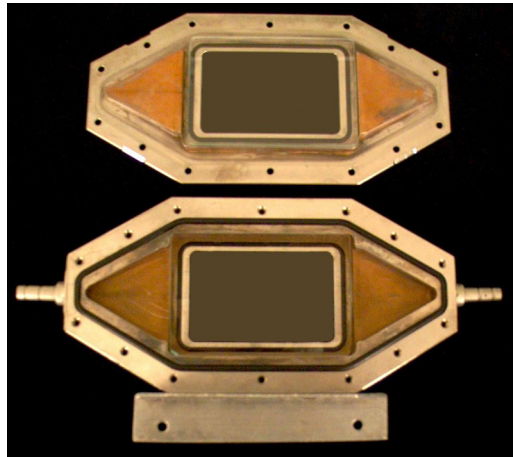
**Figura 5.1** – Célula de fluxo utilizada para a adesão de células.

Esta célula de fluxo consiste de uma câmara de latão revestida com níquel (dimensões  $16 \times 8 \times 1.8$  cm) e de duas placas de vidro posicionadas nas partes inferior e superior (dimensões  $5.5 \times 3.8$  cm) da câmara. Entre as duas placas existe um separador de teflon de modo a criar uma distância de separação de 0.06 cm. Esta célula de fluxo foi montada num microscópio óptico invertido com câmara digital para captura de imagens ao longo do tempo.

## 5.1. MATERIAIS E MÉTODOS

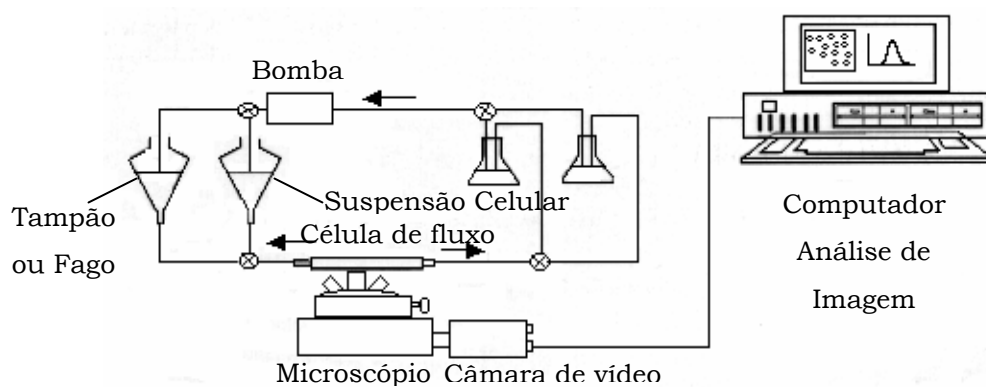
### 5.1.1 Célula de Fluxo

A adesão de células a superfícies de vidro foi efectuada numa célula de fluxo paralelo (em regime laminar).



**Figura 5.2** – Fotografia da célula de fluxo utilizada no trabalho experimental.

A célula de foi colocada num microscópio óptico invertido (Nikon, Diaphot 300) e utilizou-se uma objectiva de contraste de fase com ampliação de 40× (Figura 5.3).



**Figura 5.3** – Sistema utilizado para a adesão de células.



Durante o período de adesão de células fez-se captura de imagens utilizando para tal uma câmara CCD (Sonny, AVC-D5CE) e um programa de aquisição de imagem (*Image Proplus 3.0*, Media Cybernetics, Maryland).

### 5.1.2 Adesão de Células

Antes de cada ensaio todo o sistema foi lavado com água ultra-pura estéril durante aproximadamente 1 hora e sem recirculação. Seguidamente fez-se passar MCN durante 30 minutos.

Cresceram-se culturas de *P. fluorescens* durante 24 horas a 26°C. Posteriormente centrifugaram-se as culturas (7,000×g, 10 minutos, 4°C) e ressuspendeu-se o *pellet* em MCN. A D.O. foi acertada para aproximadamente 1.0.

A suspensão de *P. fluorescens* foi colocada num dos balões do sistema. Durante a alimentação da célula de fluxo com células, o sistema funcionou com recirculação da suspensão. Quando se atingiram as  $1.7 - 1.8 \times 10^6$  células  $\text{cm}^{-2}$  parou-se a alimentação de células e começou-se a lavagem da célula de fluxo com meio MCN, sem recirculação, para remover as células não aderidas.

### 5.1.3 Infecção de Células Aderidas

Após 30 minutos de lavagem, colocou-se num dos balões uma solução fágica contendo 30ml de meio MCN e 30ml de solução fágica e começou-se a alimentar o sistema fazendo captura de imagens. No final dos ensaios lavou-se todo o sistema, durante 60 minutos, com meio MPF.

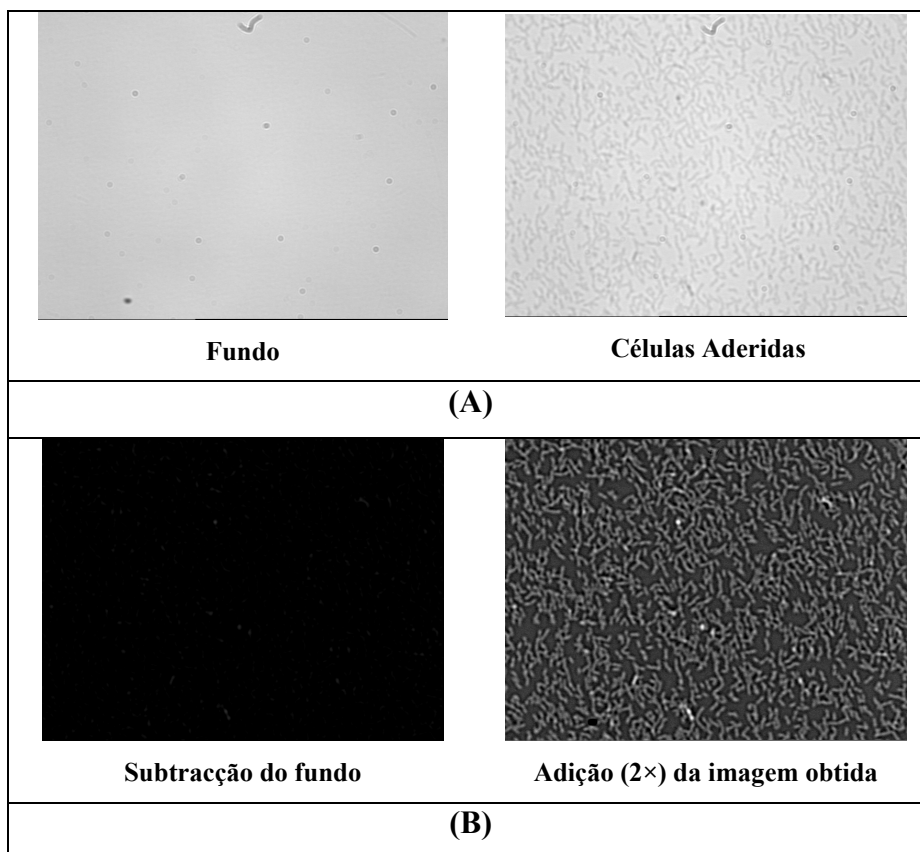
### 5.1.4 Recolonização da Superfície

Após a infecção fágica de células aderidas, estudou-se a recolonização da superfície de vidro. Para tal, após a lavagem do sistema com meio MPF, iniciou-se novamente a alimentação do sistema com suspensão de *P. fluorescens* (D.O.= 1.0). Após o recomeço da alimentação foram capturadas imagens durante aproximadamente 90 minutos.

### 5.1.5 Processamento das Imagens

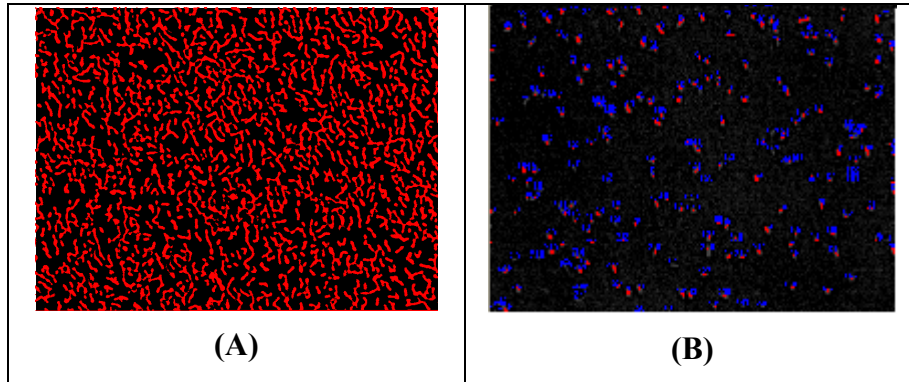
As imagens obtidas conforme descrito no item anterior foram posteriormente tratadas utilizando um *software* desenvolvido pela Sigma (*Sigma Scan Pro 5*). Cada imagem contém  $768 \times 576$  pixels<sup>2</sup>.

Antes de se iniciar cada ensaio de adesão gravou-se uma imagem do fundo. O *Sigma Scan Pro 5* através da sub-rotina *Image Math* faz a subtracção do fundo de cada uma das imagens obtidas durante os diferentes ensaios de adesão, infecção e recolonização efectuados. Esta função do programa permite a eliminação de todos os ruídos existentes. Após a subtracção do fundo a imagem foi somada a uma imagem igual. Este procedimento permitiu aumentar o contraste dos objectos. A Figura 5.4 mostra todos os passos necessários utilizando a sub-rotina *Image Math*.



**Figura 5.4** – Imagens do fundo e de uma superfície com células (A) e passos da sub-rotina *Image Math* utilizados para melhorar a qualidade da imagem (B) .

Após o melhoramento das imagens foi necessário utilizar a sub-rotina *Intensity Threshold* para aplicar uma cor aos objectos de modo a permitir a posterior contagem dos mesmos com o *Measure Objects*.



**Figura 5.5** –Exemplos de imagens após as sub-rotinas *Intensity Threshold* (A) e *Measure Objects* (B) do *Sigma Scan Pro 5*.

O *Measure Objects* fornece uma folha de cálculo com o número de objectos e as respectivas áreas.

### 5.1.6 Cálculo do Número de Células por $\text{cm}^2$

As equações que se seguem demonstram como se efectuou o cálculo do número de células por  $\text{cm}^2$ .

O número de pixels de uma imagem é calculado através da equação:

$$N.^{\circ} \text{Pixels} = \text{Pixels Altura} \times \text{Pixels Largura} = 768 \times 576 = 4.42 \times 10^5 \quad (1)$$

O cálculo do número de pixels de uma imagem é necessário para se determinar a área da imagem. Sabendo que cada  $2.5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2$  correspondem a 21955 pixels, tem-se que:

$$\text{Área Imagem} (\text{cm}^2) = \left( \frac{4.42 \times 10^5 \times 2.5 \times 10^{-5}}{21955} \right) = 5.04 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \quad (2)$$

Sabendo a área da imagem é então possível determinar o número de células por  $\text{cm}^2$  através da equação:

$$N.º \text{ Células} / \text{cm}^2 = \frac{\text{Área Total}}{\text{Área Média}} \times \frac{1}{5.04 \times 10^{-4}} \quad (3)$$

em que a *Área Total* corresponde à área de cada objecto medido através do *Measure Objects* e a *Área Média* é a área média obtida de três células individuais de *P. fluorescens*.

### 5.1.7 Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)

Diferentes amostras foram analisadas utilizando microscopia electrónica de varrimento e a respectiva técnica de espectrometria de dispersão de energia (*EDS – Energy Dispersive Spectrometer*).

#### i) Análise de Superfícies por EDS

As seguintes superfícies foram analisadas utilizando a técnica de EDS.

- Superfície de vidro
- Superfície de vidro com células aderidas em condições estáticas
- Superfície de vidro com células aderidas e posterior infecção com fago em condições estáticas
- Superfície de vidro com fago
- Superfície de vidro com fago aderido e posterior adesão de células em condições estáticas.

Esta técnica permite a análise da composição química através da medição da energia e intensidade de distribuição do sinal dos raios X gerados por um feixe de energia focalizado na superfície.

#### ii) Coloração Negativa de Fagos para SEM

Para observar melhor os fagos presentes nas superfícies utilizou-se um método de coloração negativa com ácido fosfotúngstico para microscopia electrónica. O protocolo consistiu em colocar 20µl de solução contendo fago em lamelas de vidro ou em superfícies de mica e deixar, em repouso, durante 1 a 3 minutos. O excesso de fago foi retirado virando a superfície e absorvendo o excesso com a ajuda de papel.

Colocaram-se, em seguida, 10µl de ácido fosfotúngstico por cima da superfície e deixou-se a actuar durante 1 minuto. O excesso de ácido fosfotúngstico foi retirado, tal como descrito previamente, e deixou-se a superfície a secar à temperatura ambiente. As amostras para microscopia electrónica de varrimento foram revestidas com ouro.

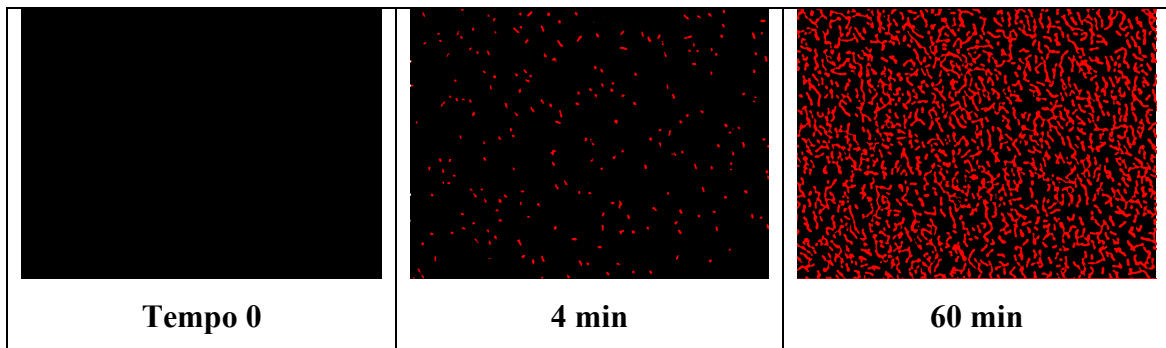
### **5.1.8 Microscopia de Epifluorescência**

As amostras de bactérias e de fagos para microscopia óptica de epifluorescência foram coradas de acordo com os protocolos com SYBR Green I e com DAPI descritos no Capítulo 2 (2.1.4).

## 5.2. RESULTADOS

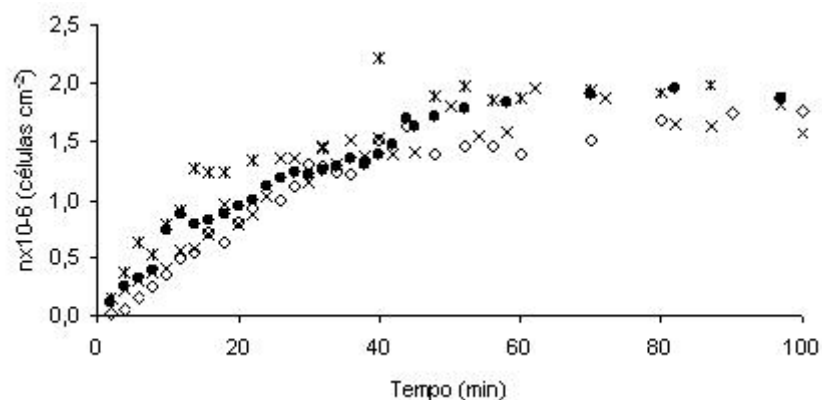
### 5.2.1 Adesão Celular de *P. fluorescens* a Superfícies de Vidro

O estudo da adesão de *P. fluorescens* a superfícies de vidro foi realizado utilizando uma célula de fluxo com escoamento em regime laminar. Na Figura 5.6 mostram-se algumas imagens obtidas durante um ensaio de adesão de *P. fluorescens*.



**Figura 5.6** – Imagens de células de *P. fluorescens* aderidas ao longo do tempo a uma superfície de vidro após tratamento de imagem com o *Sigma Scan Pro 5*.

A Figura 5.7 mostra o número de células de *P. fluorescens*, ao longo do tempo, em quatro ensaios de adesão realizados.

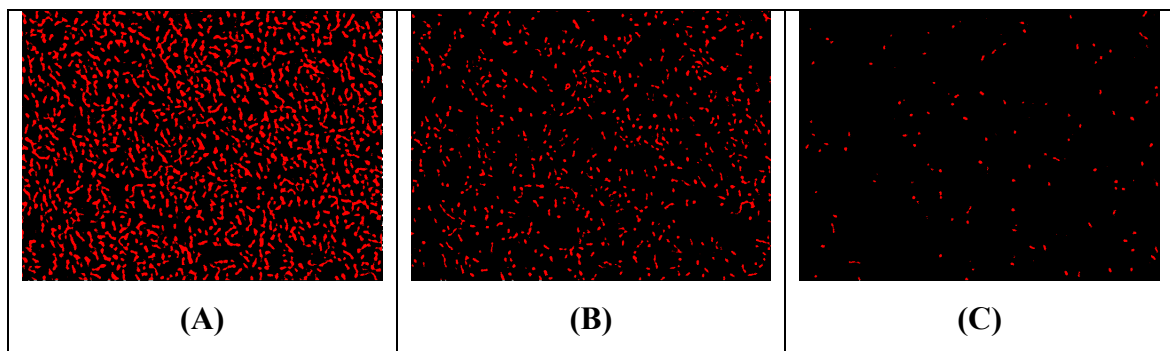


**Figura 5.7** – Cinética de adesão de células de *P. fluorescens* a uma superfície de vidro.

Como se pode verificar a partir da Figura 5.6 a velocidade de adesão de células foi aproximadamente a mesma em todos os ensaios realizados, o que demonstra a reprodutibilidade do método. A adesão máxima é obtida aproximadamente após 50 minutos de recirculação da suspensão celular. Assim, após 60 minutos de adesão iniciou-se a lavagem do sistema com MCN para remover as células não aderidas ao vidro.

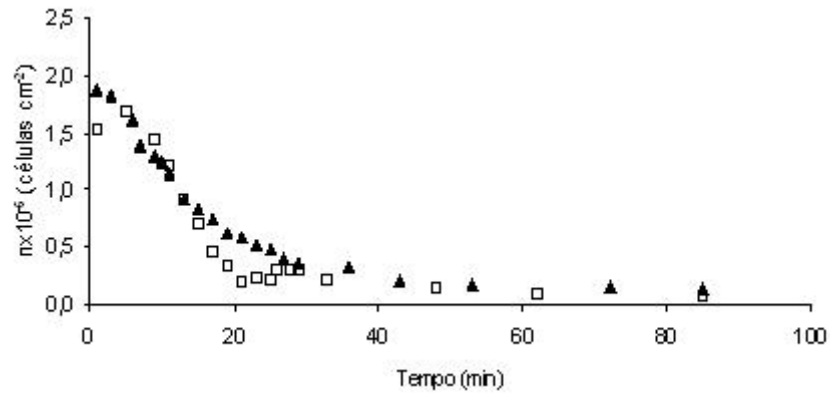
### 5.2.2 Infecção Fágica de Células Aderidas

Após a adesão de células à superfície e respectiva lavagem do sistema iniciou-se a infecção fágica das células aderidas. A Figura 5.8 mostra a superfície de vidro colonizada com células de *P. fluorescens* durante o processo de infecção.

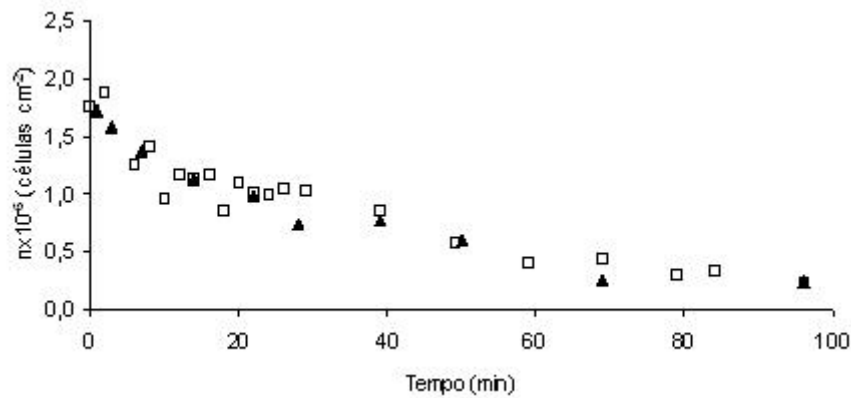


**Figura 5.8** – Infecção fágica de células de *P. fluorescens* aderidas a uma superfície de vidro: antes da infecção fágica (A), após um determinado período de tempo de infecção (B) e no final da infecção fágica (C).

Como se pode verificar o número de células após a infecção fágica diminuiu bastante. Neste trabalho testou-se o efeito da concentração inicial de fago (PFU/ml) na remoção de células aderidas. As cinéticas de remoção encontram-se apresentadas nas Figuras 5.9 e 5.10.



**Figura 5.9** – Cinética de remoção de células aderidas, após infecção fágica (PFU/ml =  $1 \times 10^{10}$ ).



**Figura 5.10** – Cinética de remoção de células aderidas, após infecção fágica (PFU/ml =  $2 \times 10^9$ ).

Como se pode verificar o modo de infecção de células aderidas foi diferente quando se utilizaram títulos iniciais de fago diferentes. A utilização de um título mais elevado causou a remoção de aproximadamente 90% das células aderidas em aproximadamente 20-30 minutos enquanto que com um título inferior a mesma percentagem de remoção foi atingida ao fim de 80 minutos.

Na Tabela 5.1 encontram-se resumidos os parâmetros de infecção de células de *P. fluorescens* aderidas ao vidro para cada um dos títulos de fago estudados.

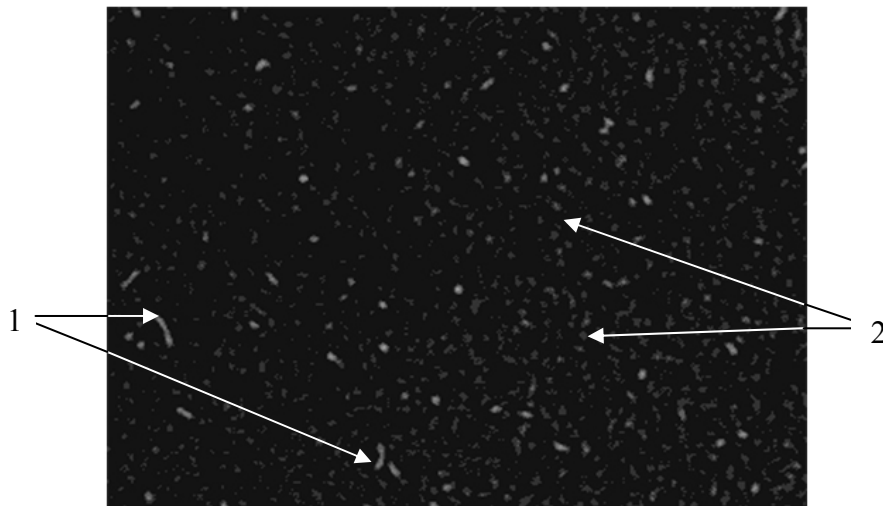


**Tabela 5.1** - Efeito do título do fago inicial na taxa de remoção de células por  $\text{cm}^2$  e na percentagem de células removidas.

Título do Fago (PFU/ml)	Taxa de Remoção (Cél. $\text{cm}^{-2} \text{min}^{-1}$ )	Percentagem de Remoção (%)
$2 \times 10^9$	$0.024 \pm 0.002$	$93.4 \pm 0.01$
$1 \times 10^{10}$	$0.073 \pm 0.027$	$93.5 \pm 1.51$

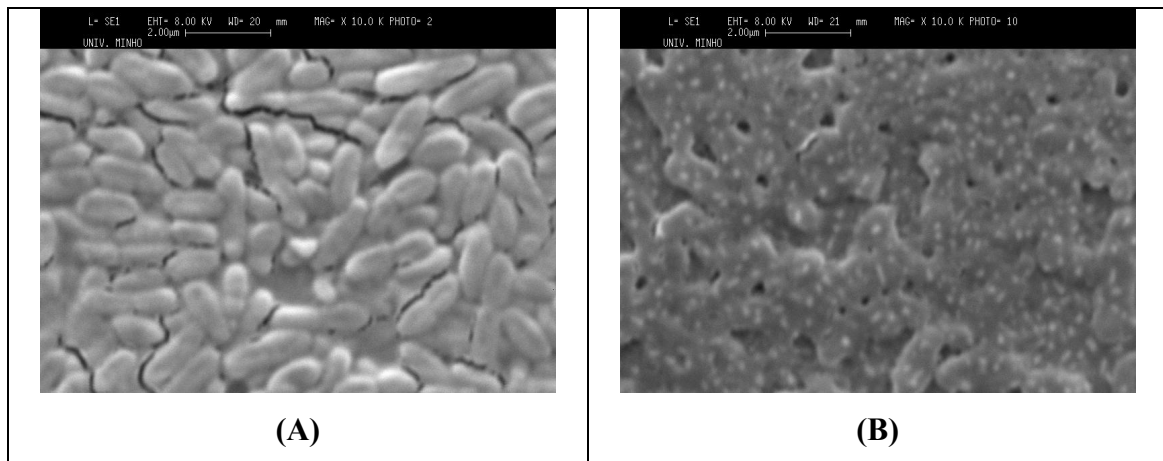
Como se pode verificar pela observação da Tabela 5.1 a taxa de remoção é afectada pelo título do fago, no entanto no final obtém-se uma percentagem de remoção de células semelhante. No final dos ensaios de infecção verificou-se que restavam sempre células na superfície de vidro, ou seja a eficiência de remoção não foi de 100%.

A Figura 5.11 mostra uma superfície de vidro após a infecção fágica.



**Figura 5.11** – Restos celulares de *P. fluorescens* numa superfície de vidro (1 – bactérias; 2 – restos celulares).

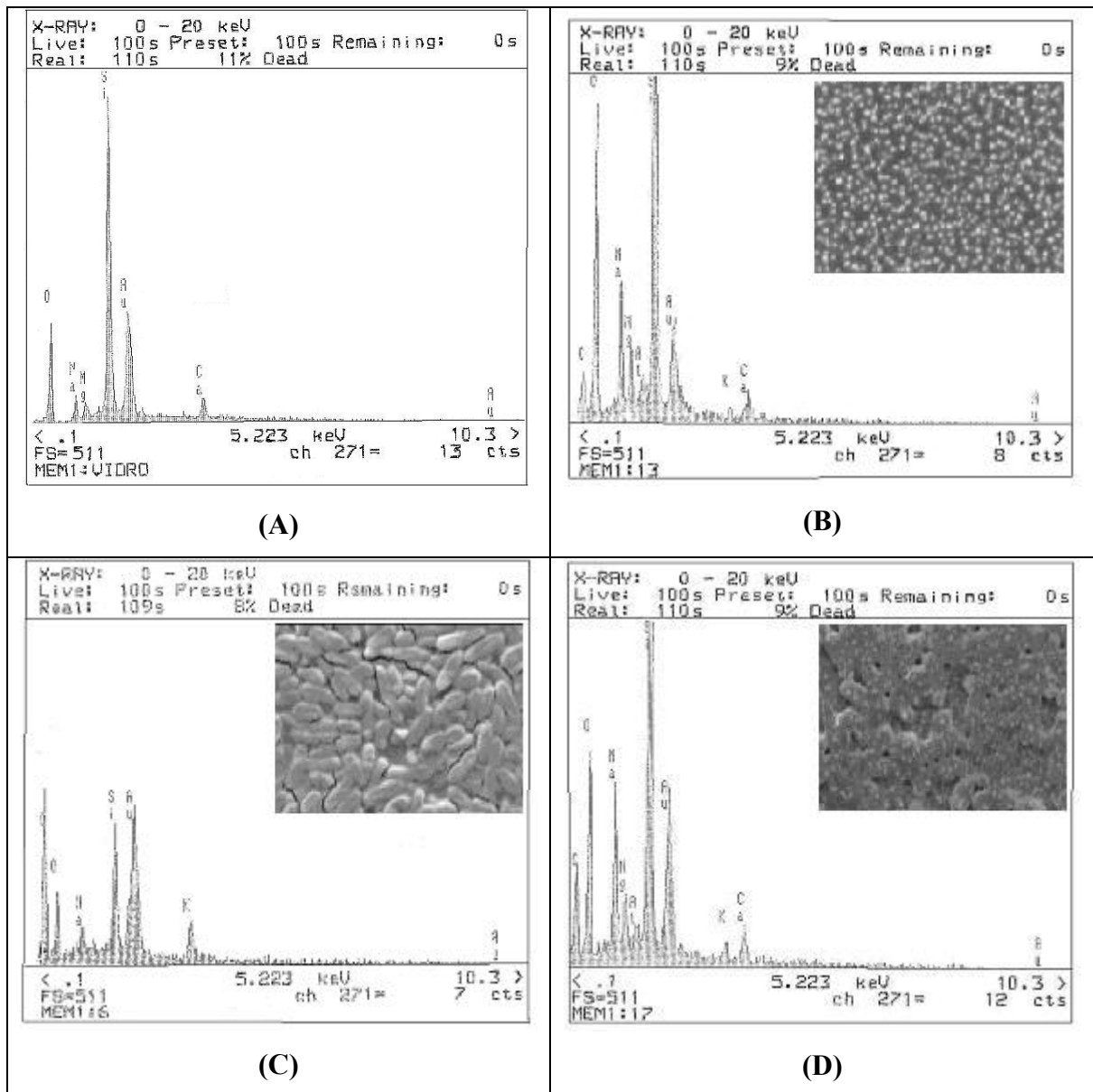
Como é possível verificar encontram-se na superfície de vidro restos celulares e células de *P. fluorescens*. As superfícies de vidro foram também observados por microscopia electrónica de varrimento (SEM). Na Figura 5.12 apresentam-se algumas imagens obtidas por microscopia electrónica de varrimento.



**Figura** Erro! Não existe nenhum texto com o estilo especificado no documento..12 – Imagens SEM (ampliação 10000×) da superfície colonizada com células de *P. fluorescens* antes (A) e após (B) a infecção fágica.

A observação SEM permite verificar que após a infecção a superfície ficou revestida por restos celulares e fagos (que correspondem na imagem B aos pontos brancos).

A composição química das superfícies foi estudada utilizando a técnica EDS. Na Figura 5.13 apresentam-se os espectros obtidos de EDS e as respectivas imagens de SEM.



**Figura 5.13** – Espectros EDS e imagens SEM (ampliação 10000×) de diferentes superfícies: superfície de vidro (A), vidro revestido com fago (B), vidro revestido com *P. fluorescens* (C) e vidro após infecção fágica de *P. fluorescens* aderidas (D).

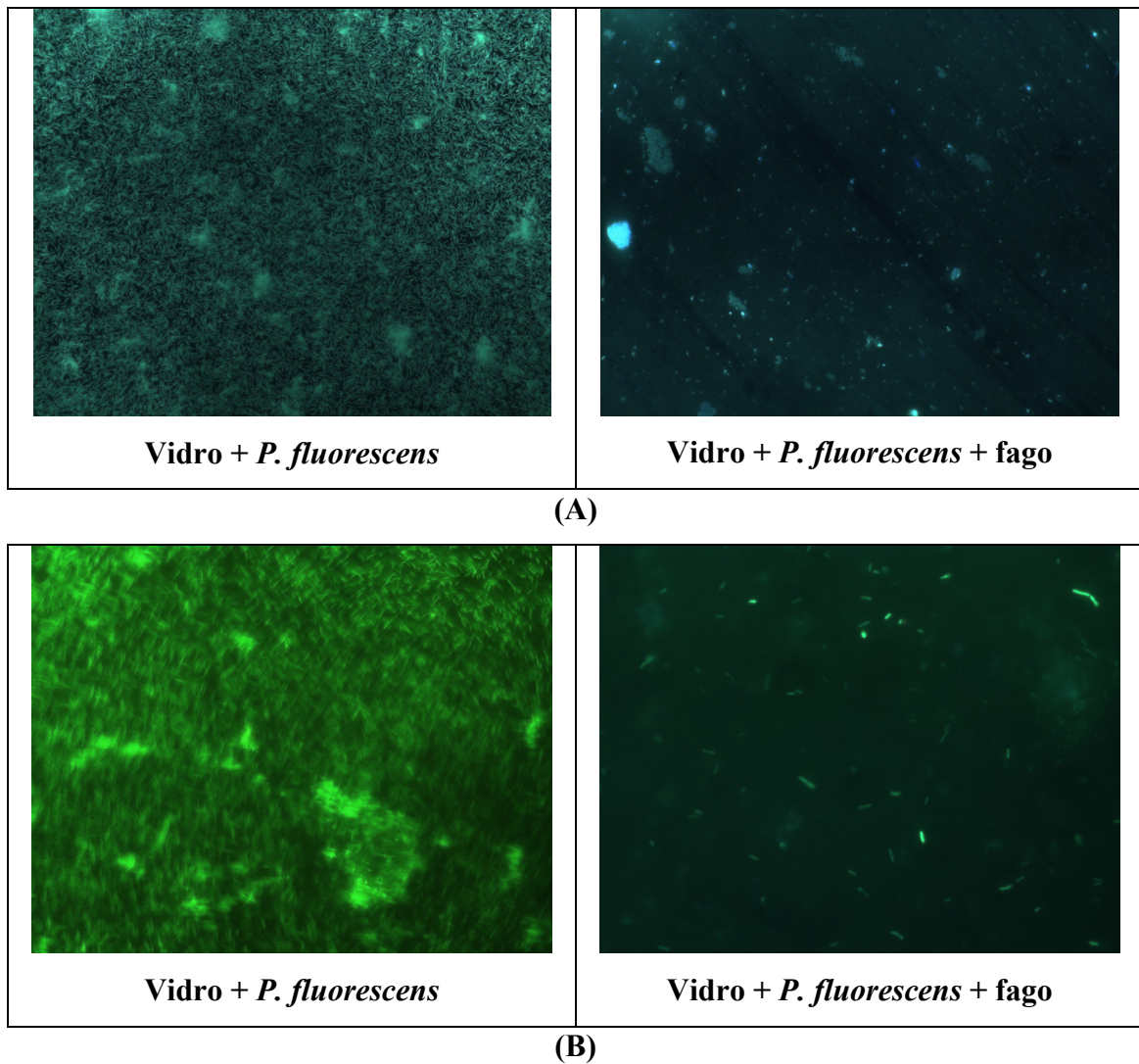
Na Tabela 5.2 encontra-se resumida a composição química obtida por EDS de cada uma das superfícies analisadas.

**Tabela 5.2** – Composição química das amostras analisadas por EDS.

Amostra	C	O	Na	Mg	Si
Vidro	-	+	+	+	+++
Vidro + Fago	+	++++	++	++	+++
Vidro + <i>P. fluorescens</i>	+++	++	+	-	+
Vidro + <i>P. fluorescens</i> + Fago	++	+++	+++	++	+++

A presença de carbono (C) é indicativa da existência de biomassa na superfície. Sendo assim, era já de esperar um pico de C superior em superfície revestidas com células relativamente a amostras com fago. A infecção fágica de uma superfície revestida de *P. fluorescens* originou a diminuição do C existente uma vez que o fago provoca a lise celular. As superfícies de vidro são compostas por silício. Quando as superfícies se encontram revestidas com células há uma grande diminuição na quantidade de Si, no entanto após a infecção fágica observa-se um aumento de Si devido ao desaparecimento de células da superfície. Quanto ao sódio e ao magnésio estes encontram-se no tampão utilizado na preservação do fago e daí haja um aumento destes picos nas amostras com fago.

As superfícies acima referidas foram também observadas por microscopia óptica de epifluorescência. A Figura 5.14 mostra os resultados dessas observações.

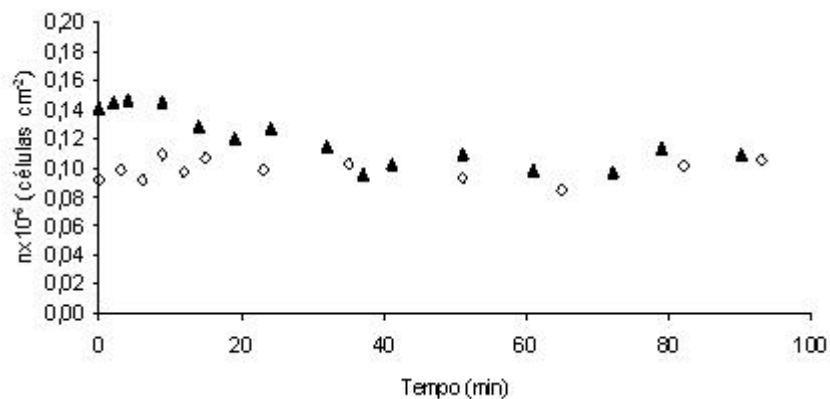


**Figura 5.14** – Imagens de microscopia de epifluorescência com (A) SYBR Green I e (B) DAPI.

Mais uma vez é possível verificar que a acção do fago elimina as células existentes de uma superfície. A coloração de amostras de *P. fluorescens* infectadas com fago com SYBR Green I permite a visualização de pequenos pontos, pontos inferiores ao tamanho de células, que correspondem a fagos. Sendo assim, a coloração com SYBR Green I é melhor para a observação de fagos, apesar de ambos serem corantes específicos para ADN.

### 5.2.3 Recolonização da Superfície

A seguir ao período de infecção fágica todo o sistema foi lavado de modo a remover o maior número de fagos. A remoção total não foi conseguida e ficaram no sistema, em todos os ensaios realizados, aproximadamente  $10^3$  PFU/ml. Após a lavagem iniciou-se o processo de recolonização da superfície com *P. fluorescens* (D.O.~ 1.0). A Figura 5.15 mostra o número de células aderidas durante o período de recolonização.



**Figura 5.15** – Número de células aderidas durante os ensaios de recolonização.

Como se pode verificar, a adesão de células não ocorreu. As variações registadas durante os ensaios foram provavelmente devido a células que estariam a passar no momento da captura de imagem. A não recolonização da superfície pode ser devido ao fago ter ficado aderido à superfície ou aos restos celulares aderidos à superfície.

### 5.3. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A adesão de células a superfícies encontradas em diferentes ambientes tem sido estudada já há várias décadas. As células aderidas em áreas como a medicina e diferentes indústrias (ex.: laticínios) são possíveis focos de infecção e economicamente prejudiciais. Assim, é essencial estudarem-se mecanismos e agentes de remoção destas células aderidas para se prevenir a formação de biofilmes.

Neste trabalho avaliou-se a utilização de fagos como possíveis agentes controladores da formação de biofilmes. Para tal, estudaram-se duas concentrações diferentes de fagos para testar se a eliminação era dependente deste factor. A utilização de um título de fago superior causou a redução, em cerca de 20 minutos, de aproximadamente 90% das células aderidas enquanto que, um título inferior resultou numa remoção das células mais demorada (aproximadamente 80 minutos) (Figura 5.9 e 5.10). Assim, verificou-se que a taxa de lise celular foi influenciada pelo título do fago (Tabela 5.1). A possível explicação para uma taxa de lise celular superior, quando se utiliza uma solução fágica mais concentrada, pode ter a ver com a razão fago/célula existente. Com uma solução concentrada o contacto entre os fagos e as respectivas células hospedeiras é mais rapidamente promovido iniciando-se, por essa razão, mais depressa a lise das células aderidas. Apesar desta influência, o número de células lisadas foi aproximadamente idêntico, tendo-se no final obtido uma eficiência de remoção da ordem dos 93-94% com os dois títulos diferentes. Após a eliminação da maioria das células verificou-se que, no final de todos os ensaios, permaneciam ainda algumas células aderidas às superfícies. Essas células, não eliminadas pelos fagos, encontravam-se bastante dispersas e, por esse motivo, a interacção fago-célula poderá ter sido dificultada e desse modo reduzida a probabilidade de infecção.

No final dos ensaios as superfícies foram examinadas por ME e MEP e observou-se que se encontravam nestas restos celulares e fagos aderidos. Estudos em que se tratou células de *P. fluorescens* ATCC 13525 com brometo de cetiltrimetil amónio (CTAB), um surfactante catiónico, mostraram que após o tratamento com este

agente, os restos celulares que permaneceram na superfície formavam uma superfície ideal que propiciava a recolonização (Azeredo *et al.*, 2003; Simões *et al.*, 2003). No presente estudo, a recolonização das superfícies, após a eliminação das células aderidas utilizando fagos, não foi verificada. A possível explicação para este acontecimento pode ser a existência de fagos nas superfícies, mesmo após o processo de lavagem verificado quer por microscopia quer por EDS. Esses fagos poderão ser responsáveis pela infecção imediata do hospedeiro ao recolonizar a superfície. Por outro lado, a presença de restos celulares, resultantes da lise pelo fago, na superfície do vidro poderá ter inibido a adesão de novas bactérias. Vários estudos têm demonstrado que superfícies contendo células aderidas e submetidas a sonicação ou à passagem de interface ar/líquido dificilmente voltavam a ser recolonizadas (Gómez-Suárez; 2001 e Gómez-Suárez; 2002; Neu, 1996). Segundo Neu (1996) as células bacterianas quando destacadas da superfície deixam substâncias de origem polissacárida designadas por *foot-prints* que podem inibir ou induzir a adesão bacteriana.

Os resultados obtidos com este trabalho demonstram que os fagos poderão ser utilizados para remover biofilmes no estado inicial de formação e também para proteger as superfícies de uma posterior recolonização. Sendo assim, a aplicação de fagos na eliminação e posterior prevenção contra a adesão de células é, de acordo com os resultados obtidos, uma boa estratégia no combate aos biofilmes.



## 5.4. BIBLIOGRAFIA

- Azeredo J, Pacheco A P, Lopes I, Oliveira R, Vieira M J (2003) *Monitoring cell detachment by surfactants in a parallel plate flow chamber*. Water Science and Technol. **47**;5:77-82.
- Bos R, van der Mei H C, Busscher H J (1995) *A quantitative method to study co-adhesion of micro-organisms in a parallel plate flow chamber. II Analysis of the kinetics of co-adhesion*. J Microbiol Methods. **23**:169-182.
- Busscher H J, Geertsema-Doornbusch G I, van der Mei H C (1997) *Adhesion to silicone rubber of yeasts and bacteria isolated from voice prostheses: influence of saliva conditioning films*. J Biomed Mat Res. **34**:201-210.
- Busscher H J, Bos R, van der Mei H C (1995) *Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion*. FEMS Microbiol Lett. **128**:229-234.
- Flint S H, Bremer P J, Brooks J D (1997) *Biofilms in dairy manufacturing plant – description, current concerns and methods of control*. Biofouling. **11**:81-97.
- Gómez-Suárez C, Busscher H J, Van der Mei H C (2001) *Analysis of bacterial detachment from substratum surfaces by the passage of air-liquid interfaces*. Appl Env Microbiol. **67**:2531-2537.
- Gómez-Suárez C, Pasma J, van der Borden A J , Wingender J, Flemming H-C, Busscher H J, Van der Mei H C (2002) *Influence of extracellular polymeric substances on deposition and redeposition of Pseudomonas aeruginosa to surfaces*. Microbiology. **148**:1161-1169.
- Kojima N, Shiota M, Sadahira Y, Handa K, Hakomori S (1992) *Cell adhesion in a dynamic flow system as compared to static system*. J Biol Chem. **267**:1264-1270.
- Neu T R (1996) *Significance of bacterial surface active compounds in interaction of bacteria with interfaces*. Microbiol Rev **60**:151-166.

- Notermans S, Dormans J A M A, Mead G C (1991) *Contribution of surface attachment to the establishment of microorganisms in food processing plants: a review*. *Biofouling*. **5**:21-36.
- Percival S L, Knapp J S, Wales D S, Edyvean R J (1999) *Biofilm development in potable quality water*. *Biofouling*. **13**:259-277.
- Rijnaarts H H M, Norde W, Bouwer E J, Lyklema J, Zehnder A J B (1993) *Bacterial adhesion under static and dynamic conditions*. *Appl Environm Microbiol*. **59**:3255-3265.
- Schulze H J, Wahl B, Gottschalk G (1989) *Determination of adhesive strength of particles with the liquid/gas interface in flotation by means of a centrifugal method*. *J Colloid Interface Sci*. **128**:57-65.
- Sutherland I W (1977) *Bacterial exopolysaccharides, their nature and production*. In *Surface Carbohydrates of the Prokaryotic Cell*, pp-27-96. Edited by I W Sutherland. London, New York, San Francisco: Academic Press.
- Zottola E A, Sashara K C (1994) *Microbial biofilm in the food processing industry – should they be concerned?* *Int J Food Microbiol*. **23**:125-148.

## CAPÍTULO 6 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO

Os resultados obtidos permitiram verificar que a infecção fágica de culturas de *Pseudomonas fluorescens* pelo fago  $\Phi$ S1 depende da temperatura e meio de infecção bem como da temperatura e fase de crescimento do hospedeiro. A baixa eficiência do fago quando infectou células crescidas às temperaturas diferentes da óptima poderá estar relacionada com a ausência de expressão de receptores de superfície. Neste trabalho foi possível identificar duas proteínas ou conjuntos de proteínas de peso molecular aproximadamente 17.5 kDa e 99 kDa que parecem ser responsáveis pela ligação do fago às superfícies celulares. Estas proteínas não se encontram presentes, também, quando as células são crescidas em meio diferente do óptimo. A qualidade do hospedeiro influencia também o desempenho do fago sendo a eficiência máxima obtida quando as células se encontram na fase exponencial de crescimento. À medida que as células vão envelhecendo a taxa de lise celular resultante da infecção fágica vai diminuindo e conseqüentemente ocorre a diminuição da libertação de fagos para o meio extracelular.

Relativamente à infecção de biofilmes de *P. fluorescens* com o fago  $\Phi$ S1 obteve-se uma percentagem de remoção celular elevada (aproximadamente 85%), bastante superior à geralmente obtida com agentes químicos (25%). Há, no entanto, factores que condicionam o desempenho do fago. Verificou-se que, tal como na infecção de culturas planctónicas em diferentes fases de crescimento, uma qualidade inferior do hospedeiro (biofilme 13 dias) resultou numa diminuição da eficiência da infecção. Também a temperatura quer de infecção quer de crescimento do biofilme influenciaram a infecção fágica. Verificou-se que, tal como na infecção de culturas planctónicas, a temperatura óptima de infecção de biofilmes foi de 26°C. Temperaturas

de infecção diferentes da óptima influenciaram negativamente o processo de infecção. A temperatura de crescimento do biofilme influenciou, também, o desempenho do fago tal como sucedeu em culturas suspensas. A comparação do desempenho do fago em células planctónicas na fase exponencial de crescimento e em biofilmes revelou que, apesar da taxa de remoção da biomassa total ter sido semelhante, a taxa de lise celular e de libertação de fagos foi inferior no biofilme. Este facto poderá estar relacionado com a existência no biofilme de células em diferentes fases de crescimento. Os resultados de infecção de biofilme permitiram verificar que durante o processo de lise ocorria também a hidrólise da matriz polimérica o que poderá estar relacionado com a libertação de enzimas induzidas pelo fago. Este aspecto de infecção deveria ser aprofundado em trabalhos futuros, uma vez que a utilização destas enzimas poderá constituir uma alternativa ao controlo químico de biofilmes.

No que respeita à infecção de células aderidas, os resultados obtidos mostraram que o fago  $\Phi$ S1 poderá ser utilizado eficientemente para remover células na fase inicial de um processo de formação de biofilmes. Verificou-se que a concentração de fago utilizado influencia a rapidez de remoção de células aderidas no entanto, a taxa de remoção global não parece ser influenciada pela quantidade de partículas fágicas, tendo-se obtido em média uma percentagem de remoção de 93%. Uma mais valia da utilização de fagos no controlo de biofilmes no estado inicial de formação é também o facto de estes prevenirem a recolonização da superfície com *P. fluorescens*.

No geral, a aplicação de fagos como agentes controladores tanto de células no forma planctónica como de células aderidas ou biofilmes deve ser considerada no futuro, pois poderá ser uma boa opção em alternativa aos tradicionais agentes químicos. No entanto, devido ao facto da sua eficiência ser dependente das condições de infecção e crescimento do hospedeiro a utilização de fagos está limitada às condições óptimas. No sentido de se estudar a aplicabilidade da utilização de bacteriófagos no controlo de biofilmes industriais, na sua maioria formados por múltiplas espécies microbianas, a diferentes temperaturas e a diferentes regimes de escoamento, sugere-se:

- a realização de estudos de infecção fágica de biofilmes formados por múltiplas espécies de bactérias;

- a formação de biofilmes em células de fluxo aplicando diferentes regimes de escoamento e a posterior infecção desses biofilmes com fago;

- a utilização de fagos e hospedeiros isolados de ambientes industriais, bem como a combinação de fagos diferentes no sentido de se ter um produto fágico com uma maior gama de actuação;

- a investigação do efeito da combinação de fagos ou mesmo de enzimas induzidas pelo fago, com biocidas no controlo de biofilmes industriais.