



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA**

**DETECÇÃO DE BACTERIÓFAGOS QUE INFECTAM
BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO EM ÁGUA DE
PRODUÇÃO DE UM RESERVATÓRIO DE PETRÓLEO
“OFFSHORE”**

MAYARA KRETZER KREMER

Florianópolis – SC
2017

MAYARA KRETZER KREMER

**DETECÇÃO DE BACTERIÓFAGOS QUE INFECTAM
BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO EM ÁGUA DE
PRODUÇÃO DE UM RESERVATÓRIO DE PETRÓLEO
“OFFSHORE”.**

Dissertação de mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Química
do Centro Tecnológico da
Universidade Federal de Santa
Catarina, como requisito parcial
para a obtenção do título de Mestre
em Engenharia Química

Área de concentração: Processos Biotecnológicos.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Moreira Soares
Coorientadora: Profa. Dra. Dolores Ursula Mehnert

Florianópolis – SC
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Kremer, Mayara Kretzer

Detecção de Bacteriófagos que Infectam Bactérias Redutoras de Sulfato em
Água de Produção de um Reservatório de Petróleo “*offshore*” / Mayara Kretzer
Kremer ; orientador, Hugo Moreira Soares ; coorientadora. Dolores Ursula
Mehnert. Florianópolis, SC, 2017.

123 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro
Tecnológico. Programa de Pós Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências.

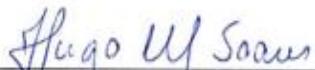
1. Engenharia Química. 2. bactérias redutoras de sulfato (BRS). 3. *Souring*.
4. controle microbiano. 5. bacteriófagos. I. Soares, Hugo Moreira. II. Mehnert,
Dolores Ursula. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

**Deteccão de Bacteriófagos que Infectam Bactérias Redutoras
de Sulfato em Água de Produção de um Reservatório de
Petróleo Offshore**

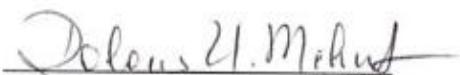
por

Mayara Kretzer Kremer

Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos** e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

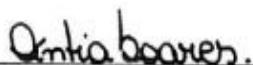

Prof.^a Dr. Hugo Moreira Soares

orientador



Prof.^a Dr.^a Dolores Ursula Mehnert

coorientadora



Prof.^a Dr.^a Cintia Soares

coordenadora

Banca Examinadora:


Dr. Marcio Luis Busi da Silva


Dr. Lindomar Alberto Lerin

Florianópolis, 28 de julho de 2017.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Hugo Moreira Soares, pela oportunidade e orientação ao longo do trabalho.

À minha coorientadora Prof.^a Dra. Dolores Ursula Mehnert, pela paciência, apoio, por todos os ensinamentos compartilhados e por toda a sua dedicação à minha pesquisa e por sua amizade.

À Dra. Telma Alves Monezi, pela amizade, risadas e conselhos durante toda a minha estadia em São Paulo.

Às amigas, Elizabeth e Márcia, pelas palavras de apoio e pela companhia incansável durante a realização dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Beny Spirado do Laboratório de Genética Bacteriana (ICBII/USP) que, gentilmente, cedeu sua estrutura e reagentes. O agradecimento se estende a toda a sua equipe, em especial, ao Henrique, que estava sempre disposto a ajudar.

À Profa. Dra. Silvana Cai que, gentilmente, cedeu a estrutura do seu laboratório.

Aos colegas do Laboratório de Tratamento Biológico de Resíduos (LTBR), em especial a Mirian, a qual sempre me ajudou com a manutenção dos reatores e pelo ombro amigo. Agradeço a todos pela amizade, pelo companheirismo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química e à Universidade Federal de Santa Catarina.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

Às amigas, por todo apoio, amizade, carinho e compreensão durante esses anos.

À minha *Teacher*, Patrícia, pelas palavras motivacionais e o *help* nas horas finais da dissertação.

Ao meu namorado Edson, pela compreensão, carinho, amor, por toda paciência comigo durante esse período e principalmente pelo companheirismo.

À minha tia Eroni (*in memoriam*), agradeço pelos ensinamentos e amor e ao meu primo Guilherme, pela recepção e todo o apoio em São Paulo.

E, em especial, à minha família, sempre presente. Agradeço, principalmente, aos meus pais por não medirem esforços para que eu conseguisse alcançar meus objetivos.

RESUMO

O controle do crescimento microbiano é um desafio crescente na produção de petróleo e gás, uma vez que a presença de determinadas bactérias traz impactos econômico e ambientalmente negativos. As bactérias redutoras de sulfato (BRS) são particularmente problemáticas, uma vez que, entre outros efeitos prejudiciais, são responsáveis pela corrosão biológica ligada à produção de sulfeto de hidrogênio, efeito conhecido como “*souring*”. A principal forma de controle das BRS, atualmente, é a injeção de biocidas, no entanto, esta estratégia, além de requerer aplicação contínua, tem se revelado pouco efetiva na eliminação de biofilmes e é associada a um alto risco de contaminação das águas. Portanto, é necessário que se busque abordagens mais eficientes e específicas em relação ao controle microbiológico. O uso de bacteriófagos (vírus que infectam bactérias) vem ao encontro destas necessidades, pois após se multiplicarem, geralmente, provocam a lise celular, liberando novas partículas virais e evitando, assim, que a bactéria se prolifere. Diante disso, este estudo propôs estabelecer um método para concentração e detecção de bacteriófagos de Bactérias Redutoras de Sulfato presentes em água de reator, oriunda de poços de petróleo. As amostras foram coletadas de dois reatores, operados em batelada alimentada, utilizados para geração e manutenção de uma microbiota enriquecida em BRS. As amostras de água de reator foram primeiramente clarificadas e, em seguida, os vírus concentrados por ultracentrifugação. O concentrado viral foi então purificado com Vertrel-XF e o DNA viral extraído por diversos processos. Ensaios de semeadura experimental de fago P1, nas amostras de água do reator, revelaram uma taxa de recuperação viral de 27,7%, face aos 16% obtidos por outros pesquisadores. A detecção por PCR, entretanto, não revelou a presença de miofagos nas amostras, devido a presença de inibidores inespecíficos.

PALAVRAS-CHAVE: bactérias redutoras de sulfato (BRS), *Souring*, controle microbiano, bacteriófagos.

ABSTRACT

The control of microbial growth is a growing challenge in the production of oil and gas, since the presence of certain bacteria has economic and environmental negative impacts. Sulphate reducing bacteria (SRB) are particularly problematic because, among other harmful effects, they are responsible for the biological corrosion associated with the production of hydrogen sulphide, an effect known as *souring*. Nowadays, the main form of controlling the SRB is the injection of biocides. However, this strategy, besides requiring continuous application, has proved ineffective in the elimination of biofilms and is associated with a high risk of water contamination. Therefore, it is necessary to seek more efficient and specific approaches to microbiological control. The use of bacteriophages (phages) meets these needs, because after they multiply, they usually cause cell lysis, releasing new viral particles and therefore preventing the bacteria from proliferating. Thus, this study proposes to establish a method for concentration and detection of bacteriophages of Sulphate Reducing Bacteria present in reactor water from oil wells. The samples were collected from two reactors, operated in fed batch, used to generate and maintain a SRB enriched microbiota. The reactor water samples were first clarified and then the virus concentrated by ultracentrifugation. The viral concentrate was then purified with Vertrel-XF and viral DNA extracted by several procedures. Experimental sowing trials of phage P1 in the water samples of the reactor revealed a viral recovery rate of 27.7%, compared to the 16% obtained by other researchers. PCR detection, however, did not reveal the presence of myofagos in the samples due to the presence of nonspecific inhibitors.

KEY WORDS: Sulphate reducing bacteria (SBR), souring, control of microbial, bacteriophage.

NOMENCLATURA E SIMBOLOGIA

AGV	Ácidos Graxos Voláteis
BRS	Bactérias Redutoras de Sulfato
BRN	Bactérias Redutoras de Nitrato
C-CH ₃ CH ₂ COO ⁻	Concentração em mg.L ⁻¹ de carbono em propionato
C-CH ₃ COO ⁻	Concentração em mg.L ⁻¹ de carbono em acetato
CH ₄	Metano
CO ₂	Dióxido de Carbono
CQAs	Compostos Quartanários de Amônia
DBNPA	2,2-Dibromo-3-nitrilopropionamida
DDGE	<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>
DNA	Ácido Desoxorribonucleico
ERIC-PCR	<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequences</i>
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
HAV	Vírus da Hepatite A
HS ⁻	Sulfeto
H ₂	Hidrogênio
H ₂ S	Sulfeto de Hidrogênio
ICTV	<i>Internacional Committee on Taxonomy of Viruses</i>
KOH	Hidróxido de potássio
μL	Microlitro
MEOR	Recuperação Avançada de Petróleo por Microrganismos
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MgO ₂	Peróxido de magnésio
MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> (<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina)
NMP	Número Mais Provável
N – NO ₃ ⁻	Concentração em mg.L ⁻¹ de nitrogênio em nitrato
pb	Pares de base
PBS	Solução Salina Fosfatada
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogênico
pmoles	Picomoles
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotações Por Minuto
SSF	Concentração de sólidos suspensos fixos
SST	Concentração de sólidos suspensos totais
SSV	Concentração de sólidos suspensos voláteis
S ⁻²	Sulfeto

SO_4^{-2}	Sulfato
SO_3^{-2}	Sulfito
$\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$	Tiosulfato
T	Temperatura
t	Tempo
<i>Taq</i>	DNA polimerase (<i>Thermus aquaticus</i>)
THPS	<i>Tetrakis Hidroximetilfosfonio Sulfato</i>
<i>Tth</i>	DNA polimerase (<i>Thermus thermophilus</i>)
UFP	Unidade Formadora de Placa
Viradel	<i>Vírus-adsortion-elution</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de recuperação secundária de petróleo através da reinjeção da água produzida (PWRI) comumente utilizado em campos continentais	30
Figura 2- Estruturas comuns nos bacteriófagos e características morfológicas específicas	37
Figura 3 - Adsorção do fago a uma célula hospedeira e consequente penetração por injeção do ácido nucléico.....	39
Figura 4 - Modelo esquemático de infecção viral - <i>Microviridae</i>	40
Figura 5 - Tipos de ciclos fágicos	40
Figura 6 - Classificação dos bacteriófagos com base na morfologia e no tipo de ácido nucléico.....	42
Figura 7 - Morfotipos de bacteriófagos.....	42
Figura 8 - Bacteriófago P1	44
Figura 9 - Placas de lise celular causadas por bacteriófagos	53
Figura 10 - Imagem de microscopia de epifluorescência.....	54
Figura 11 - Representação esquemática do processamento da amostra	62
Figura 12 - Representação esquemática da avaliação de recuperação viral em amostras de água do reator.....	67
Figura 13 - Imagens da titulação viral, antes do processo de concentração viral	75
Figura 14 - Imagens da titulação viral antes do processo de concentração viral	76
Figura 15 - Resultado da padronização da PCR para detecção de miofagos.....	86
Figura 16 - Detecção de miofagos nas amostras do Reator 1 por PCR.	87
Figura 17 - Detecção de miofagos nas amostras do Reator 2 por PCR.	88
Figura 18 - Resultado do ensaio para avaliação da presença de inibidores nas amostras de água dos reatores pela PCR.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição das famílias de bacteriófagos	36
Tabela 2 - Etapas do processo de multiplicação viral	38
Tabela 3 - Resumo das principais técnicas de concentração de vírus em amostras ambientais	50
Tabela 4 - Composição da água do mar sintética	58
Tabela 5 - Solução de elementos-traço.....	58
Tabela 6 - Composição iônica da água do mar.....	59
Tabela 7 - Produção de sulfeto em função do consumo dos substratos, após 48 horas.....	73
Tabela 8 - Caracterização do lodo dos Reatores	74
Tabela 9 - Índice de recuperação do método de concentração viral aplicado à amostras de água do reator, determinado por titulação	79
Tabela 10 - Resultados da quantificação do DNA extraído com TRIzol, Kit Power Soil DNA e Kit ZR Viral DNA/RNA	82

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 OBJETIVO GERAL	24
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 MICRORGANISMOS EM RESERVATÓRIOS DE PETRÓLEO E GÁS	25
2.2 BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO	27
2.2.1 Relação entre as Bactérias Redutoras de Sulfato e o <i>Souring</i>	29
2.2.2 Controle microbiano de Bactérias Redutoras de Sulfato	31
2.2.2.1 Injeção de biocidas nos poços de petróleo e gás	31
2.2.2.2 Aplicação de nitrato e/ou nitrito nos poços de petróleo e gás ...	33
2.2.2.3 Controle dos níveis de oxigênio no fluido injetor	33
2.2.2.4 Remoção de sulfato por processo de Nanofiltração	33
2.2.2.5 Uso de bacteriófagos como tecnologia alternativa no controle das bactérias redutoras de sulfato	34
2.3 BACTERIÓFAGOS	34
2.3.1 Características gerais e classificação	36
2.3.2 Multiplicação viral	37
2.3.3 Classificação	41
2.3.3.1 <i>Myoviridae</i>	43
2.3.4 Aplicações de bacteriófagos na indústria, medicina e biotecnologia	45
2.3.5 Bacteriófagos em poços de petróleo e gás	46
2.3.6 Métodos de detecção de bacteriófagos em amostras de água	48
3 MATERIAIS E MÉTODOS	57
3.1 OPERAÇÃO DOS REATORES	57
3.1.1 Procedência	57
3.1.2 Manutenção do sistema	57
3.2 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	60
3.2.1 Cromatografia de íons	60
3.2.2 Determinação de Sólidos Suspensos Totais (SST), Sólidos Suspensos Fixos (SSF) e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)	60
3.3 AMOSTRAGEM	61
3.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	61
3.4.1 Processamento do Sedimento	62
3.4.2 Processamento do Sobrenadante	63
3.4.3 Tratamento das amostras com Vertrel-XF[®]	63
3.5 CULTURA BACTERIANA	64

3.5.1 Linhagem Bacteriana.....	64
3.6 CULTIVO VIRAL.....	64
3.6.1 Protótipo Viral	64
3.6.2 Preparo das suspensões dos protótipos virais.....	64
3.6.2.1 Lisado viral	64
3.6.2.2 Concentrado viral.....	65
3.6.2.3 Titulação do protótipo viral.....	65
3.7 AVALIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO VIRAL EM AMOSTRAS DE ÁGUA DO REATOR	66
3.7.1 Semeadura Experimental	66
3.8 PESQUISA DE VÍRUS NAS AMOSTRAS DE ÁGUA DE REATOR PELA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO PELA POLIMERASE (PCR).....	68
3.8.1 Extração de DNA viral	68
3.8.1.1 Extração de DNA viral com reagente TRIzol™	68
3.8.1.2 Extração de DNA viral utilizando kit <i>Power Soil DNA</i> (MoBio®)	69
3.8.1.3 Extração de DNA viral utilizando kit ZR Viral DNA/RNA™ (ZymoResearch).....	69
3.8.2 Quantificação espectrofotométrica do DNA extraído.....	69
3.8.3 Amplificação do DNA viral	69
3.8.3.1 Reação de Amplificação – PCR.....	70
3.8.3.2 Detecção dos fagos nas amostras de água dos reatores por PCR	71
3.8.3.3 Determinação da presença de inibidores inespecíficos da reação de PCR nas amostras de água de reator	71
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	72
4 RESULTADOS	73
4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS REATORES DE CULTURA DE MICRORGANISMOS.....	73
4.2 PREPARO DE SUSPENSÃO DE PROTÓTIPO VIRAL	74
4.3 MÉTODO DE PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	76
4.3.1 Avaliação da Recuperação de Viral em amostras de água do reator.....	78
4.4 PESQUISA DE VÍRUS NAS AMOSTRAS DE ÁGUA DE REATOR	81
4.4.1 Extração de DNA	81
4.4.2 Amplificação do DNA viral.....	83
4.4.2.1 Determinação de parâmetros para PCR	85
4.4.2.2 Detecção viral na água dos reatores	86

5 CONCLUSÕES	93
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	95
REFERÊNCIAS	97
ANEXOS	115
ANEXO A – Meio de Cultura LB-Ágar	115
ANEXO B – MEIO DE CULTURA LB	117
ANEXO C – Meio de cultura LB composto	119
ANEXO D – Meio de Cultura Top-Ágar	121
ANEXO E - Remoção de Sais do DNA	123

1 INTRODUÇÃO

O crescimento microbiano ocorre naturalmente em diferentes ambientes, conforme as condições físicas, químicas e biológicas, sejam esses naturais ou ligados à atividade humana.

Desde o início da produção comercial de petróleo, aproximadamente, 140 anos atrás, a presença de microrganismos vem causando problemas na extração de petróleo e gás. Embora os estudos recentes tenham ajudado a esclarecer o papel das populações microbianas na produção de petróleo e gás natural, as implicações mais amplas ainda são uma área emergente de pesquisa. Muitas dessas populações, ao se estabelecerem em poços de extração, provocam impactos econômico e ambientalmente negativos (MAGOT; OLLIVIER; PATEL, 2000).

As bactérias redutoras de sulfato (BRS) são problemáticas, uma vez que são responsáveis pela geração biológica de sulfeto de hidrogênio (H_2S), substância diretamente ligada ao *souring*, o qual ocasiona a acidificação dos reservatórios de petróleo e gás, causando efeitos prejudiciais à indústria. A forma convencional de controle microbiano nos poços é a injeção de biocidas. Contudo, essa técnica apresenta desvantagens econômicas, ambientais e baixa eficiência em certas condições, demonstrando a necessidade de investigação de novas alternativas e/ou aprimoramento das já utilizadas.

O Laboratório de Tratamento Biológico de Resíduos (LTBR) da UFSC vem, desde 2007, desenvolvendo técnicas de controle do *souring* em poços de petróleo, utilizando nitrato como inibidor da sulfato-redução. No entanto, essa técnica mostrou-se eficiente durante um período de tempo limitado, inibindo a sulfato-redução, porém, não inibiu o crescimento das bactérias, fazendo com que a necessidade de injeção de nitrato se tornasse crescente para manter a inibição desejada (resultados não publicados).

Uma alternativa que surgiu é o uso de bacteriófagos (fagos) específicos, que são capazes de infectar as bactérias, causando a sua lise celular. O uso de fagos como biocidas, tem se tornado uma alternativa interessante, em especial, os fagos virulentos (de ciclo lítico), os quais têm como uma das principais vantagens sobre o uso de biocida a capacidade de autorreplicação, o que aumenta por si só a dosagem do vírus ao longo do curso do tratamento (ZARASVAND; RAI, 2014).

Após infectar a célula hospedeira, o fago define qual o ciclo de replicação que irá seguir, o ciclo lítico, e redireciona o metabolismo dos hospedeiros para que os fagos gerados causem a lise da célula

hospedeira e infectem outras bactérias (HALON, 2007). Já, no ciclo lisogênico (fagos temperados), o fago insere seu DNA no cromossomo do hospedeiro, permanecendo na célula hospedeira, num estado latente (pró-fago), até que um ciclo lítico seja induzido por um fator físico ou químico (ZARASVAND; RAI, 2014).

O uso de coquetéis ou de fagos polivalentes aumenta as chances de sucesso no controle microbiano na área ambiental, porque amplia o espectro de hospedeiros infectados (HU; MIYANAGA; TANJI, 2012).

Os bacteriófagos (fagos) apresentam características que possibilitam sua aplicação em diversas áreas como a medicina e, mais recentemente, a engenharia, garantindo seu uso como agente de controle microbiano. No entanto, os fatores que influenciam esse processo ainda requerem muita pesquisa e estudo para consolidar essa técnica, em especial, na área ambiental, na qual é comum a formação de biofilmes e a heterogeneidade bacteriana.

Considerando os problemas causados pelas BRS em poços de petróleo e gás e devido à ausência de metodologia específica para o estudo de fagos existentes nas amostras de água desses poços, este trabalho tem o objetivo de estabelecer um método para detecção de bacteriófagos presentes nesses ambientes.

1.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer um método para detecção de bacteriófagos de Bactérias Redutoras de Sulfato presentes em água de reator, oriunda de poços de petróleo.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Enriquecer um consórcio bacteriano anaeróbio em reator com alimentação em batelada, a partir de água de produção de poço de petróleo *offshore*.
- b) Estabelecer um método de concentração viral e determinar a eficiência de recuperação.
- c) Estabelecer a melhor metodologia para purificação das amostras e obtenção do DNA viral.
- d) Padronizar os parâmetros para detecção de miofagos nas amostras através de reação de amplificação genômica pela polimerase (PCR).
- e) Verificar a presença de bacteriófagos nas amostras de água de reatores.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MICRORGANISMOS EM RESERVATÓRIOS DE PETRÓLEO E GÁS

Quando comparado com as demais áreas da ecologia microbiana ambiental, existem poucos estudos voltados para reservatórios de petróleo e gás, principalmente, tratando-se de superfícies profundas. Um dos principais fatores da escassez de estudos mais aprofundados é a dificuldade da extração de amostras locais. Devido ao fato de muitos reservatórios estarem localizados em locais de difícil acesso, a coleta de amostras pode ocasionar riscos pessoais e econômicos para a companhia detentora do direito de exploração. Por isso, mesmo sendo de interesse da indústria de petróleo ter conhecimento da vida microbiana nestes locais, ainda há muito estudo e pesquisa a serem feitos.

A origem das populações microbianas em reservatórios de petróleo e gás ainda é bastante discutida, mas, acredita-se que em reservatórios convencionais podem ser tanto autóctones quanto introduzidas exogenamente durante a perfuração e/ou injeção de água para o fraturamento hidráulico (DAVIS; STRUCHTEMEYER; DAVIS; ELSHAHED, 2012).

Uma das fontes de contaminação microbiana nesses poços é o grande volume de fluido de perfuração, que são bombeados para resfriar e lubrificar a broca de perfuração e manter a pressão de fundo de poço para evitar uma ruptura. Fluidos de perfuração possuem em sua formulação uma mistura de vários componentes, como por exemplo: celulose, a qual confere viscosidade; barita, que confere peso, e lignossulfonados com água, que auxiliam na diluição do fluido (PEREYRA et al., 2010).

Pereyra et al. (2010) comentam que os componentes utilizados nos fluidos de perfuração podem servir como fonte de carbono e sulfato para os microrganismos. Outros fatores facilitam a contaminação e proliferação de microrganismos, sendo a temperatura um deles, já que ela interfere no fluido de perfuração quando preparado e utilizado, principalmente com o fato dele ser deixado sem proteção no ambiente. Vale ressaltar, também, que, durante a perfuração, grandes volumes do fluido acabam ficando retidos na formação rochosa dos reservatórios, o que ocasiona a introdução de microrganismos no local (STRUCHTEMEYER; DAVIS; ELSHAHED, 2011).

Outra fonte de contaminação nos reservatórios são os fluidos de fraturamento hidráulico. Esses fluidos são usados para fraturar rochas a

partir da alta pressão, bem como transportar propantes (material sólido com poder abrasivo, utilizado para potencializar o fraturamento) e outros aditivos químicos.

Doe (2009) descreve a composição típica do fluido de fraturamento hidráulico, a qual é constituída por 90% de água, 9,5% de areia e 0,5% de aditivos químicos. Entre os aditivos mais utilizados estão: ácidos, que ajudam a dissolver os minerais; sal, utilizado como um conservante para retardar a degradação de polímeros de gel; poliacrilamida, um lubrificante; etileno-glicol, um inibidor de escala; sais de borato, que ajudam a manter a viscosidade do fluido; glutaraldeído, um biocida; goma de guar, que serve como um espessante; isopropanol, para aumentar a viscosidade; e ácido cítrico, utilizado para evitar a precipitação de óxidos de metal. A composição química exata de tais fluidos é confidencial, apenas as empresas detêm-nas (KARGBO; WILHELM; CAMPBELL, 2010).

Observando os aditivos químicos utilizados, observa-se o fato que tais fontes de carbono estão classificadas como biodegradáveis, ou seja, são capazes de garantir o crescimento de microrganismos específicos. Além disso, alguns desses componentes podem servir, também, como fontes de fósforo, enxofre, ou nitrogênio que tendem a ser, naturalmente, limitados no reservatório. Vale ressaltar que as partículas sólidas dos aditivos com superfície disponível podem servir como uma matriz para a fixação de populações microbianas e formação de biofilme (BOTTERO et al., 2013).

A grande maioria das bactérias, uma vez estabelecidas no interior do reservatório, como em todos os ambientes naturais, tende a existir na forma de biofilmes ou micro-colônias (CURTIS; SLOAN; SCANELL, 2002). Segundo Volk e Hendry (2010), o efeito da formação de biofilme na porosidade e permeabilidade de reservatórios é conhecido, sendo uma característica frequentemente explorada nas estratégias de Recuperação Avançada de Petróleo por Métodos Microbianos (MEOR).

No entanto, as condições ambientais nos reservatórios têm um impacto importante sobre o crescimento microbiano e sua sobrevivência. Dentre os fatores limitantes para o crescimento de bactérias nesses locais, encontra-se disponibilidade de fontes de carbono e demais nutrientes, temperatura, pressão, salinidade, pH, entre outros.

Os poços apresentam temperaturas acima de 120°C, salinidade e pH extremos limitam a diversidade biológica e a atividade microbiana. Por outro lado, a alta pressão dentro dos reservatórios de petróleo (até 500 atm) não impede o crescimento bacteriano, embora possa influenciar nas suas propriedades fisiológicas e metabólicas.

Quanto aos doadores potenciais de elétrons, eles incluem metano (CH_4), hidrogênio (H_2), ácidos graxos voláteis (acetato, propionato e benzoato) e hidrocarbonetos de petróleo. O potencial redox é baixo em campos de petróleo profundos e alguns receptores de elétrons (oxigênio, nitrato e ferro férrico) são geralmente ausentes. No entanto, a água do fraturamento hidráulico contém sulfato, ferro (III) e carbonato, que podem garantir os processos metabólicos, tais como a redução de sulfato, metanogênese e acetogênese (MAGOT; OLLIVIER; PATEL, 2000).

2.2 BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO

Bactérias redutoras de sulfato (BRS) são procariotas, as quais podem ser divididas em quatro linhagens bacterianas, conforme análise das sequências de 16S rRNA: BRS mesofílicas Gram-negativas; BRS Gram-positivas formadoras de esporos; BRS bactérias termofílicas e BRS arqueias termofílicas, sendo que todos esses grupos se caracterizam por usar o sulfato como aceptor final de elétrons durante a respiração anaeróbica (CASTRO; WILLIAMS; OGRAM, 2000).

Os principais gêneros de bactérias redutoras de sulfato são *Desulfovibrio*, as quais fazem parte do grupo de redutores de sulfato não oxidante de acetato, são bacilos curvos com flagelação polar, sem esporos, gram-negativos e termofílico.

Desulfobacter compõe o grupo dos redutores de sulfato oxidantes de acetato, são bacilos, sem esporos, Gram-negativos, quando móveis possuem flagelo polar. Já, as *Desulfuromonas* fazem parte do grupo redutores dissimilativos de enxofre, são bacilos, flagelo único lateral, Gram-negativos (MADIGMAN et al., 2010).

As BRS são microrganismos anaeróbios que utilizam sulfato (SO_4^{2-}) ou compostos mais reduzidos de enxofre (sulfito (SO_3^{2-}), tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$)) como aceptor de elétrons, contudo a forma mais abundante na natureza é o sulfato. Já, os compostos orgânicos são os doadores de elétrons em seu metabolismo, gerando como produtos sulfeto de hidrogênio (H_2S) e dióxido de carbono (CO_2). As BRS podem ser heterotróficas, utilizam o carbono orgânico como fonte de carbono, ou autotróficas, as quais utilizam CO_2 como fonte de carbono e hidrogênio (fonte de elétrons) (FAUQUE; BARTON, 2012). Também, são capazes de metabolizar desde de ácidos graxos de cadeia curta (propionato e acetato) até cadeia longa de ácidos graxos e compostos aromáticos (WIDDEL, 1980). Wilkes et al. (2000) descreveram que

BRS são capazes de crescer na presença de petróleo como sendo a única fonte de carbono disponível.

Taxonomicamente, por um longo período, foram divididas em dois grandes gêneros: *Desulfovibrio* e *Desulfomaculum*, mas novos gêneros vêm sendo identificados (*Desulfobacter*, *Desulfonema*, *Desulfobulbus*, *Desulfuromonas*, *Desulfosarcina*, *Desulfomicrobium*, *Thermodesulfobacterium*). Esses gêneros incluem representantes terrestres e aquáticos, com espécies halofílicas que chegam a tolerar salinidades superiores a 18% (FAUQUE; BARTON, 2012).

As BRS possuem uma ampla faixa de pH ótimo de 5 a 9, sendo que valores superiores ou inferiores a essa faixa, geralmente, resultam em uma atividade metabólica baixa ou inibitória. Já, quanto à temperatura, a maioria é mesófila (temperatura ótima entre 25 e 40°C), no entanto, algumas são psicrófilas (toleram até -5°C) e outras são hipertermofílicas (temperatura ótima superior a 75°C) (TANG; BASKARAN; NEMATİ, 2009).

No metabolismo da BRS, o sulfato pode ser reduzido de duas formas, de acordo com Postgate (1984):

- Redução Assimilativa – o sulfato é utilizado como fonte de enxofre para a biossíntese de componentes citoplasmáticos, sendo incorporado pelos organismos, compõe as estruturas químicas de aminoácidos, ácidos nucleicos e em alguns co-fatores.

- Redução Dissimilativa – sob condições anaeróbias, as BRS podem utilizar sulfato como acceptor final de elétrons no sistema de transporte de elétrons, gerando energia com a produção de sulfeto.

Esse grupo de bactérias se destaca quanto à variedade de ambientes nos quais podem ser encontradas, estando distribuídas em ambientes aquáticos e terrestres, sendo encontrados em ambientes marinhos, estuários, sedimentos e lagos salinos e hipersalinos, em águas de campos de exploração de petróleo, etc. (KLEIMKEMPER et al., 2002). Também foram detectadas em ambientes com temperaturas extremas, como fontes hidrotermais e domo de lama vulcânica (ELSGAARD; PRIEUR, 1994), em locais com alta pressão, como fendas oceânicas, jazidas de petróleo (JEANTHON et al., 2002) e em grandes profundidades, encontradas em minas de ouro da África do Sul, aquíferos basálticos nos EUA (BAKER et al., 2003) e poços petrolíferos do Golfo do México (MIRANDA-TELLO et al., 2004).

BRS compreendem um diversificado grupo que possui um papel importante nos ciclos de carbono e enxofre em condições anóxicas nos oceanos. O primeiro grande estudo microbiológico, o qual descreve a

presença de BRS em poços de petróleo, foi publicado por Bastin (1926) e o autor creditou a esses microrganismos a formação biológica do sulfeto de hidrogênio.

As BRS foram os primeiros microrganismos isolados a partir de poços de petróleo, e continuam a ser identificados como os principais constituintes de comunidades microbianas em reservatórios de petróleo e gás (GITTEL et al., 2009). Aproximadamente, 220 espécies de 60 gêneros diferentes desse tipo de bactéria já foram identificadas (BARTON; FOUQUE, 2009), sendo as mesofílicas as que causam efeitos prejudiciais (*souring*): *Desulfovibrio longus*, *D. vietnamensis*, *Desulfovibrio gabonensis* e *Desulfomicrobium apsheronum* (MAGOT; OLLIVIER; PATEL, 2000).

Para investigar o mecanismo da redução de sulfato, efeito *souring*, as espécies do gênero *Desulfovibrio* têm sido usadas como modelo de organismo (VANCE et al., 2005). As espécies, tais como, *Desulfovibrio desulfuricans* (ATCC29577), *Desulfovibrio vulgaris* (ATCC29579) e *Desulfovibrio sapovorans* (ATCC33892) estão à disposição em coleções de cultura (DECORATO, 2012).

2.2.1 Relação entre as Bactérias Redutoras de Sulfato e o *Souring*

O fenômeno conhecido como “*souring*” ocorre devido a presença de H_2S , responsável pelos efeitos prejudiciais na indústria do petróleo. Esse fenômeno está presente tanto nas operações de produção de petróleo terrestres quanto *offshore* (reservatórios de petróleo e campos marítimos). O fenômeno pode ocorrer no próprio reservatório ou na superfície das instalações de processamento e em condições de baixa ou alta temperatura. Em sistemas aquáticos, o sulfeto pode existir nas formas S^{2-} , HS^- e H_2S , dependendo do pH do meio (GIEG; JACK; FOGHT, 2011).

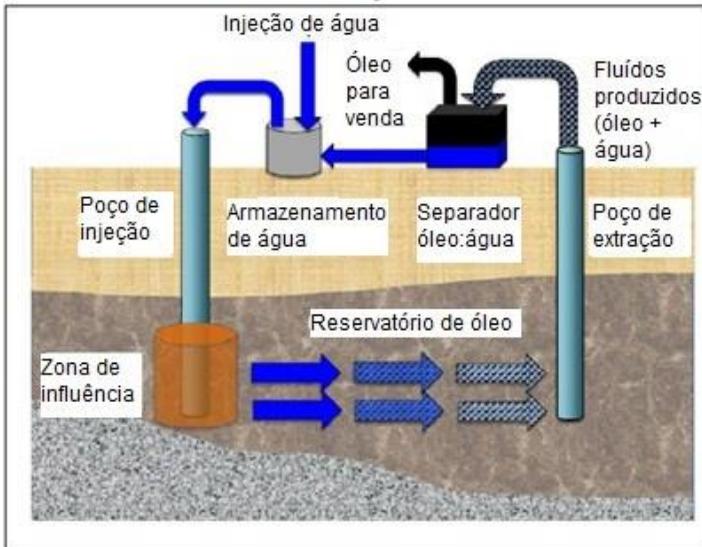
O *souring* não é exclusivamente de origem biológica, sendo que os mecanismos não biogênicos incluem decomposição de hidrocarbonetos que contêm enxofre em sua composição, dissolução de pirita e redução termoquímica do sulfato. Já a forma biológica se dá quando microrganismos reduzem, enzimaticamente, sulfato, tiosulfato ou enxofre elementar a sulfeto com o objetivo de ganhar energia para seu crescimento (LIAMLEAM; ANNACHHATRE, 2007).

Agrawal; Vanbroekhoven; Lal (2010) relataram a ocorrência de *souring* biológico durante as operações de recuperação primária de petróleo, quando o mecanismo de extração utilizado é a própria pressão

do reservatório. No entanto, é na recuperação secundária de petróleo, a qual envolve a injeção de água, que este fenômeno é mais comum.

Na recuperação secundária de petróleo, a água do mar ou outra água é injetada no fundo do poço para voltar a pressurizar o reservatório após a perda da pressão natural que ocorre durante a recuperação primária e para “varrer” o petróleo para os poços de produção (Figura 1), prolongando a vida útil de um campo de petróleo. As BRS presentes no ecossistema do reservatório, sejam elas indígenas ou introduzidas pela injeção de fluido, podem facilmente utilizar o sulfato disponível, levando ao aumento das concentrações de sulfeto no local (GIEG; JACK; FOGHT, 2011).

Figura 1 - Esquema de recuperação secundária de petróleo através da reinjeção da água produzida (PWRI) comumente utilizado em campos continentais



Fonte: Adaptado de GIEG; JACK; FOGHT, 2011.

Um reservatório de petróleo pode ser considerado acidificado (sob o efeito do *souring*) quando as concentrações de H_2S são superiores a 4 ppm ou 0,5% de enxofre em massa. Mais de 70% das reservas de petróleo do planeta são estimadas como acidificadas, por Jahn; Bos; Broeke (2012), e o mesmo vale para cerca de 40% das reservas de gás globais conhecidas (ZAKKOUR; COOK, 2010).

O *souring* causa outros problemas além da acidificação do meio, como a precipitação do sulfeto de ferro, que é responsável pela obstrução de tubulações e equipamentos. Já, as BRS são responsáveis pela corrosão da infraestrutura e oxidação do metano nos reservatórios de petróleo e gás (BARTON; FAUQUE, 2009).

Outro aspecto negativo da presença de microrganismos nos reservatórios é que eles podem alterar a composição original do petróleo ou gás, uma vez que degradam os hidrocarbonetos presentes (RÖLING; HEAD; LARTER, 2003), pois as BRS são capazes de utilizar como fonte de carbono, hidrocarbonetos de cadeia curta, tais como propano e butano, ambos presentes nos reservatórios, alterando a composição final do produto e contribuindo para a produção de H_2S (KNIEMEYER et al., 2007).

De acordo com Machel; Krouse; Sassen (1995), também existe a possibilidade de entupimento de camadas subterrâneas contendo petróleo, devido à combinação do crescimento da biomassa e sulfetos metálicos precipitados, assim podendo ocasionar a redução na eficiência de recuperação do óleo em reservatórios convencionais.

Além de tudo, o H_2S é um gás tóxico que reduz severamente a qualidade do ar, levando a problemas de saúde e segurança em ambientes operacionais (TANG; BASKARAN; NEMATI, 2009).

Também, tem-se levantado a possibilidade de que os ácidos graxos voláteis (AGV), presentes nos reservatórios, são consequência da biodegradação do petróleo por microrganismos. Tanji et al. (2014) investigaram os mecanismos que levam ao *souring* a partir da degradação biológica do petróleo nos poços e concluíram que tanto a redução do sulfato quanto a degradação de tolueno (um dos componentes do petróleo bruto) ocorrem ao mesmo tempo. De acordo com Handa et al. (2010), os ácidos graxos voláteis (AGV) são os principais doadores de elétrons para as BRS, ou seja, a própria biodegradação do petróleo contribui para acelerar o *souring*.

2.2.2 Controle microbiano de Bactérias Redutoras de Sulfato

2.2.2.1 Injeção de biocidas nos poços de petróleo e gás

Os biocidas são classificados como oxidantes ou não oxidantes (KELLAND, 2009). Entre os não oxidantes, existem as categorias dos eletrofílicos, líticos ou protonofóricos (não acopladores), com base no seu mecanismo de ação (CHAPMAN, 2003). Oxidantes e eletrofílicos são biocidas reativos que têm vários alvos na célula, enquanto os líticos

e protonofóricos atacam a membrana celular com o objetivo de dissipar o transporte de prótons para que a célula não consiga produzir energia. Cada classe biocida particular têm vantagens e desvantagens específicas, e combinações de biocidas podem interferir uns com os outros ou funcionar sinergicamente.

A escolha do biocida é um aspecto crítico de um programa de controle microbiano. Entre os critérios de seleção estão (FINK, 2011; BOIVIN *et al.*, 1992):

- custo-benefício;
- compatibilidade com os aditivos do fluido de fraturamento;
- “velocidade de ação” adequada;
- estabilidade nas condições ambientais específicas para assegurar o tempo de contato adequado;
- facilidade de transporte e aplicação;
- registro da EPA (ou perspectiva razoável de alcançar o microrganismo);
- compatibilidade com o tipo de rocha do reservatório;
- riscos ambientais.

Dentre os biocidas mais utilizados estão: glutaraldeído, formaldeído, Tetrakis hidroximetilfosfonio sulfato (THPS), 2,2-Dibromo-3-nitropropionamida (DBNPA), Bronopol, compostos quaternários de Amônia (CQAs) e acroleína.

Em geral, os biocidas não oxidantes são mais utilizados em função da sua maior estabilidade, por possuírem reatividade reduzida em relação aos componentes do fluido de faturamento, e por serem menos suscetíveis a causarem corrosão em relação aos oxidantes.

No entanto, os oxidantes são considerados de ação mais rápida, mais reativos e menos persistentes no ambiente. Eles também são menos suscetíveis ao desenvolvimento de resistência dos microrganismos, além de serem mais eficazes contra um espectro mais vasto de microrganismos. Essas características os tornam mais adequados para aplicação em sistemas de água armazenados, caso encontrado na recuperação secundária de petróleo (FINK, 2011; KELLAND, 2009).

Segundo Gieg; Jack; Foght (2011), entre as desvantagens do uso de biocidas está a dificuldade de fazê-los alcançar a parte mais profunda dos poços – prejudicando o controle de comunidades adaptadas a esses locais; o alto custo – que é potencializado pela necessidade de aplicações contínuas para se garantir eficiência; e o fato de alguns serem altamente perigosos à saúde humana e ambiental, fazendo com que o uso contínuo acabe levando ao desenvolvimento de resistência por parte

dos microrganismos. Estudos, inicialmente desenvolvidos por Gardner e Stewart (2002), apontam uma baixa efetividade desses compostos na eliminação de biofilmes.

2.2.2.2 Aplicação de nitrato e/ou nitrito nos poços de petróleo e gás

A aplicação de nitrato nos poços é uma estratégia adotada, a qual, utilizada como aceptor de elétrons pelos microrganismos, estimula o crescimento de bactérias desnitrificantes (ou redutoras de nitrato) que encontram um ambiente termodinamicamente mais favorável e acabam por vencer as BRS na competição pelo seu principal substrato (HUBERT; VOORDOUW, 2007). No entanto, algumas redutoras de nitrato também estão envolvidas em biocorrosão e diminuição de fluxos de extração em poços de petróleo e gás.

É importante salientar que essa técnica requer repetidas aplicações do nitrato, resultando em custos elevados com insumos. Além disso, pode levar ao aumento da biomassa no interior dos reservatórios, potencializando os efeitos de colmatação nos poços, o que, conseqüentemente, reduz a produção local (ECKFORD; FEDORAK, 2002).

2.2.2.3 Controle dos níveis de oxigênio no fluido injetor

Baseia-se no uso de oxigênio em fase sólida, como o peróxido de magnésio (MgO_2), para controle do *souring*, além de ser uma alternativa para aumentar os níveis de oxigênio nos poços de petróleo e gás. O peróxido de magnésio age através de dois mecanismos: abiótico (oxida sulfeto a sulfato) e biótico (inibe BRS pelo aumento do potencial REDOX no meio). Um dos aspectos negativos da técnica é que existem linhagens de BRS que são aerotolerantes (CHANG; CHANG; CHEN, 2007).

2.2.2.4 Remoção de sulfato por processo de Nanofiltração

Tal metodologia vem sendo empregada em alguns poços de petróleo e gás *offshore*, onde membranas de nanofiltração são responsáveis pela redução de 2.600 mg.L^{-1} de sulfato para valores inferiores a 50 mg.L^{-1} . Porém, a aplicação desta tecnologia torna-se inviável devido aos custos e tempo de implantação, e, principalmente, pelo grande volume de água utilizada como fluido injetor. Outro fator a se considerar é que a remoção de sulfato (dessulfatação) permite reduzir consideravelmente os níveis de sulfato, porém, sempre há uma adição de

sulfato mantendo o metabolismo das BRS ativo, mesmo em baixas concentrações (MAXWELL; SPARK, 2005).

2.2.2.5 Uso de bacteriófagos como tecnologia alternativa no controle das bactérias redutoras de sulfato

Os problemas com os métodos convencionais de controle biológico em poços de produção permitem o desenvolvimento de técnicas modernas, que passam a utilizar a biotecnologia para o controle microbiano, possibilitando abordagens mais eficientes e específicas. O uso de vírus tem se mostrado eficiente em várias áreas como a médica (JENSEN et al., 2015), a alimentícia (ROSSI; ALMEIDA, 2010), a veterinária (GONÇALVES, 2013) e a biotecnológica (ROSENBERG et al., 2010).

O uso de fagos como biocidas vem se tornando uma alternativa interessante, em especial os fagos virulentos (de ciclo lítico), os quais tem como uma das principais vantagens sobre o uso de biocida a sua capacidade de autorreplicação, o que aumenta por si só a dosagem do vírus ao longo do curso do tratamento (ZARASVAND; RAI, 2014).

O uso de coquetéis ou de fagos polivalentes aumenta as chances de sucesso no controle microbiano na área ambiental, porque amplia o espectro de hospedeiros infectados, uma vez que, quando se trata de microbiologia ambiental a heterogeneidade das amostras, em geral, é maior, mesmo num ambiente com condições mais restritas, como é o caso de águas profundas (HU; MIYANAGA; TANJI, 2012).

2.3 BACTERIÓFAGOS

Bacteriófagos (fagos) são vírus que infectam apenas as células bacterianas. Devido ao fato de não possuírem metabolismo próprio, usam o mecanismo de replicação da célula hospedeira com o intuito de fazer muitas cópias do seu genoma e conseqüentemente novos vírus, capazes de infectar outras células.

Tais vírus são ubíquos e constituem o maior grupo de vírus, pois podem infectar *Eucarya* e *Archaea*, tanto como profagos em hospedeiros específicos, como também livres na natureza em uma ampla variedade de habitats (ACKERMANN, 1996).

Primrose et al. (1982) relataram que a ecologia de bacteriófagos pode ser definida como a interação do vírus com seus hospedeiros no ecossistema e os efeitos de tais interações na composição e produtividade de um determinado habitat.

Os bacteriófagos são as entidades biológicas mais abundantes na Terra, com uma relação média de cerca de 10:1 fagos por bactéria. O maior reservatório dos vírus são os oceanos, onde a concentração varia de 10^4 a 10^7 /mL na coluna de água e mais de 10^8 /mL no sedimento (PAUL et al., 1993; WOMMACK; COLWELL, 2000; BREITBART et al., 2004; PAUL et al., 2005).

A importância dos bacteriófagos na ecologia microbiana, especialmente, no meio marinho, surgiu devido à reavaliação da função dos fagos, quanto a influência da transferência horizontal dos genes na diversidade bacteriana e também na taxa de mortalidade microbiana nos ecossistemas aquáticos. Assim, os fagos têm um impacto sobre a abundância, a diversidade e a estrutura das comunidades (PROCTOR; FUHRMAN, 1990; SUTTLE; CHAN; COTTRELL, 1990; BREITBART et al., 2007).

No ecossistema marinho, há muitos estudos avaliando a diversidade dos vírus (GREGORACCI, et al., 2015; HEARD, et al., 2006; PAUL, 2008; FILÉE, et al., 2005). Há estudos que sugerem que os vírus são responsáveis por cerca de 30-40% da mortalidade das bactérias, devido a lise celular (FUHRMAN, 2000; WOMMACK e COLWELL, 2000).

Estudos de diversidade dos vírus foram realizados por Burbano-Rosero et al. (2011), os quais determinaram a concentração de colifagos somáticos através de microscopia eletrônica em amostras de água do mar e plâncton e bivalves coletadas em três regiões costeiras de São Paulo. Nas amostras de plâncton, foram observados *Siphoviridae* (65,8%), *Podoviridae* (15,8%), *Microviridae* (15,8%) e *Myoviridae* (2,6%). Gimenes (2010) analisou a população de *Phycodnaviridae* e *Myoviridae* nos rios Cuieiras, Negro e Solimões, localizados na Bacia Amazônica, utilizando métodos moleculares (PCR, DDGE – *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*, clonagem, sequenciamento e microscopia eletrônica de transmissão – MET). Os *Myoviridae* foram detectados em todos os rios, tanto com o método PCR como com a MET.

Também foi realizada pesquisa de bacteriófagos de *Shigella sonnei* em água com suspeita de contaminação por vírus da Hepatite A (HAV) em um poço em Francisco Morato, São Paulo. Bacteriófagos de *Shigella* foram detectados na água do poço naturalmente contaminada até o nono dia de conservação em temperatura ambiente (PAULA et al., 2010). Entretanto, não há relatos, até o momento, sobre estudos relacionados à presença de fagos em águas de poços de petróleo no país.

2.3.1 Características gerais e classificação

São conhecidos cerca de 2.700 bacteriófagos, taxonomicamente organizados em 10 famílias com características morfológicas e genomas distintos (NELSON, 2004; ACKERMANN, 2011), como apresentado na Tabela 1 e Figura 2.

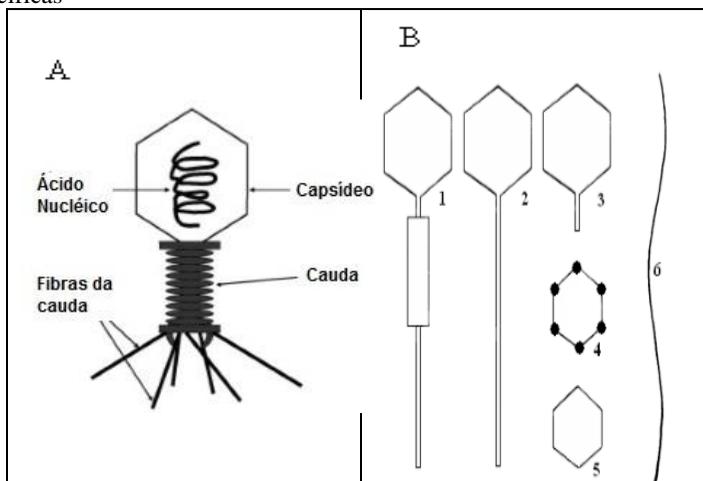
Tabela 1 - Descrição das famílias de bacteriófagos

Ordem/Família	Ácido Nucléico	Morfologia
Caudovirales		Obs.: Não envelopado
<i>Podoviridae</i>	dsDNA (L)	Cauda curta e não contrátil
<i>Siphoviridae</i>	dsDNA (L)	Cauda longa e não contrátil
<i>Myoviridae</i>	dsDNA (L)	Cauda longa e contrátil
Sem ordem definida		
<i>Corticoviridae</i>	dsDNA (C)	Capsídeo icosaédrico de parede lipídica
<i>Cystoviridae</i>	dsDNA (C)	Capsídeo icosaédrico com envelope lipídico segmentado
<i>Plasmaviridae</i>	dsDNA (C)	Pleomórfico com envelope lipídico e sem capsídeo
<i>Tectiviridae</i>	dsDNA (L)	Capsídeo icosaédrico com uma vesícula lipoprotéica interna
<i>Inoviridae</i>	dsDNA (C)	Bastonete com simetria helicoidal
<i>Leviridae</i>	dsDNA (L)	Capsídeo semi-icosaédrico
<i>Microviridae</i>	dsDNA (C)	Capsídeo icosaédrico

Legenda: C – Circular, L – Linear.

Fonte: ACKERMANN, 2011.

Figura 2- Estruturas comuns nos bacteriófagos e características morfológicas específicas



Legenda: A) Estruturas comuns nos bacteriófagos; B) Características morfológicas específicas dos diferentes tipos de bacteriófagos: 1 – Capsídeo com cauda contrátil; 2 – Capsídeo com cauda rígida; 3 – Capsídeo com cauda curta; 4 – Capsídeo grande sem cauda; 5 – Capsídeo pequeno e sem cauda; 6 – Filamento flexível sem capsídeo.

Fonte: GONÇALVES, 2013.

2.3.2 Multiplicação viral

Como os fagos não possuem metabolismo próprio, necessitam do metabolismo, dos recursos energéticos e materiais dos seus hospedeiros para sua multiplicação. O processo de multiplicação é comum a todos os vírus e compreende várias etapas (Tabela 2) (DUCKWORTH; GLENN; MCCORQUODALE, 1981).

A primeira etapa da infecção viral é a adsorção, a qual é composta por três fases: contato inicial, ligação reversível e a ligação irreversível. Os fagos ligam-se a receptores específicos existentes na superfície dos hospedeiros para iniciar a replicação.

A especificidade em relação ao hospedeiro é uma das características mais importantes dos bacteriófagos. A infecção bacteriana começa pela ligação do bacteriófago a receptores específicos na superfície das bactérias. Alguns fagos possuem um baixo espectro de infecção, enquanto outros são de amplo espectro, o que significa que podem infectar muitas espécies de bactérias únicas ou múltiplas (AZEREDO; SUTHERLAND, 2008).

De acordo com Mateus et al. (2014), é justamente essa especificidade que torna a seleção do bacteriófago correto em relação ao hospedeiro, um fator chave no sucesso no uso de fagos para o controle biológico. Esses autores testaram o uso de fagos para a inativação de *Vibrios* na aquicultura e observaram que ao utilizar um coquetel a eficiência do processo aumentava muito mais em relação ao uso de um único fago, uma vez que, nesse caso, também não estavam lidando com apenas uma espécie de hospedeiro.

Tabela 2 - Etapas do processo de multiplicação viral

Processo de multiplicação viral

1. Adsorção: interação com receptores celulares
2. Desnudamento: Separação do ácido nucléico da capa de proteína
3. Síntese: Expressão e replicação do ácido nucléico
 - a. mRNA pré-inal e síntese proteica
 - b. Replicação do ácido nucléico
 - c. mRNA final e síntese proteica
4. Montagem e maturação: Formação de novas partículas fágicas
5. Liberação de novos fagos – lise da célula hospedeira

Fonte: Adaptado de DUCKWORTH; GLENN; MCCORQUODALE, 1981.

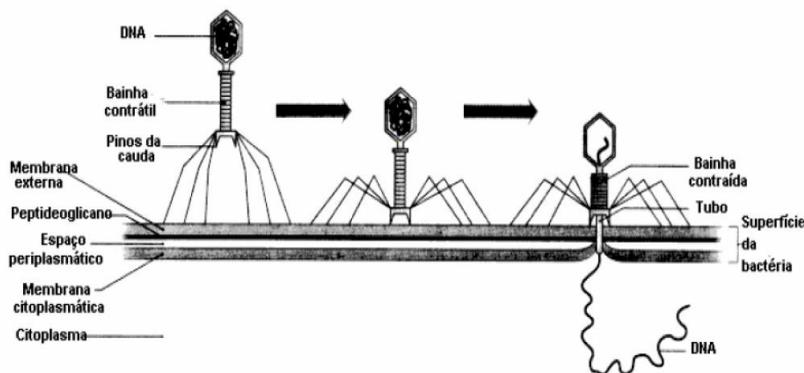
Bacteriófagos não se locomovem independentemente, já que não possuem mecanismos para tal, seu transporte no meio depende de sua adsorção aos organismos presentes ou a materiais particulados em suspensão. Por isso, esse também se torna um fator limitante à sua atividade, considerando que, se for adsorvido a um receptor impróprio, é provável que isso influencie negativamente sua difusão pelo meio. Considerando isso, Walshe et al. (2010) investigaram o efeito do pH, da força iônica, matéria orgânica dissolvida e vazão no transporte de bacteriófagos. Eles observaram que a altas vazões facilitam o transporte de vírus ligados a coloides, enquanto baixos valores de pH e força iônica elevada retardam sua mobilidade por aumentarem a adsorção das partículas virais ao meio sólido do aquífero.

Em relação aos biofilmes, a difusão de fagos também é afetada pela fase de crescimento do hospedeiro. Células vivas ativas aumentam o processo de difusão do fago no biofilme, porque eles aumentam sua proliferação proporcionalmente ao seu crescimento, enquanto que as células mortas adsorvem um grande número de fagos e, assim, interferem na sua difusão (HU; MIYANAGA; TANJI, 2012).

O contato inicial do fago com as células hospedeiras é feito através de difusão e então ocorre a ligação reversível (ligação fraca), que

pode incluir a associação de qualquer estrutura fágica à superfície celular através de forças eletrostática para implementar a adesão não específica. Então, vem a última fase da adsorção, onde ocorre a ligação irreversível (ligação forte) entre o fago e os receptores, ocasionando a compressão da cauda contráctil e injeção do DNA fágico para o interior da célula hospedeira, através da penetração da parede celular pelo tubo da cauda do fago (Figura 3).

Figura 3 - Adsorção do fago a uma célula hospedeira e consequente penetração por injeção do ácido nucléico



Fonte: PELCZAR; CHAN; KREIEG, 1993.

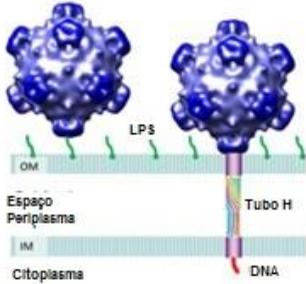
O DNA fágico ainda precisa atravessar a membrana interna da célula com a ajuda de uma proteína piloto (proteína H). A quantidade de fagos que entra na célula do hospedeiro é variável (WAGNER; HEWLETT, 1999).

Os fagos da família *Myoviridae* (exemplo: fago P1) possuem uma bainha que envolve o tubo contráctil, localizado na cauda do bacteriófago. Assim, quando o fago adere a superfície da célula hospedeira, o tubo perfura a membrana celular e o genoma é transferido para o interior da célula. Já, os membros da família *Podoviridae* (fago T7) liberam proteínas capazes de digerir camadas da membrana celular e então montam tubos ou alongam suas caudas curtas, assim, transferem seu genoma para o interior da célula (SUN et al. 2014).

Sun et al. (2014) observaram que os fagos da família *Microviridae* (ϕ X174) ao se adsorvem à superfície bacteriana iniciam a polimerização de um tubo a partir da proteína H que possibilita o deslizamento do genoma viral através do espaço periplasmático ao

citoplasma bacteriano (Figura 4). Após a infecção, o tubo é desfeito e o processo de multiplicação continua normalmente.

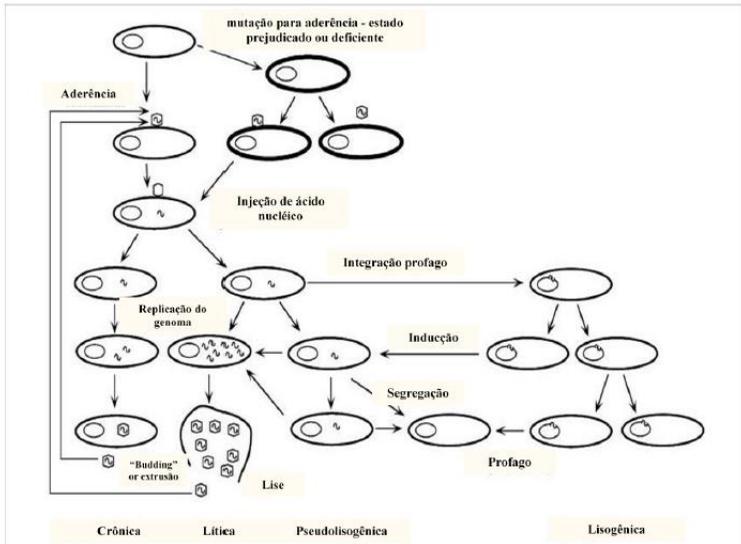
Figura 4 - Modelo esquemático de infecção viral - *Microviridae*



Fonte: SUN et al. 2014.

Após infectar a célula hospedeira podem ocorrer vários tipos de ciclos fágicos (Figura 5), sendo que a maioria destes vírus segue um ciclo lítico e outros seguem um ciclo lisogênico.

Figura 5 - Tipos de ciclos fágicos



Fonte: Adaptado de WEINBAUER, 2004.

No ciclo lítico, realizado por fagos virulentos, o fago redireciona o metabolismo dos hospedeiros para que os fagos gerados causem a lise da célula hospedeira e infectem outras bactérias (HALON, 2007).

Já no ciclo lisogênico, realizado por fagos temperados, o fago insere seu DNA no cromossomo do hospedeiro e permanece na célula hospedeira num estado latente (pró-fago). Esse material genético é replicado juntamente com o do hospedeiro sem causar lise das células, por várias gerações de bactérias, até que um ciclo lítico seja induzido por um fator físico ou químico (ZARASVAND; RAI, 2014).

2.3.3 Classificação

O sistema de classificação dos bacteriófagos é regulamentado pelo Comitê Internacional da Taxonomia de Vírus (ICTV), sendo eles os responsáveis pela atualização e aprovação da classificação. Conforme descrito por Sillankorva (2004), os fagos são classificados com base nas seguintes propriedades, definidos pela ICTV: morfologia da partícula viral; propriedade do genoma; propriedades físico-químicas (estudo da massa molecular); propriedade das proteínas; organização e replicação do genoma (estudo da ordem do genoma); propriedades biológicas (estudo da variedade de hospedeiros naturais, do modo de transmissão, relação com vetores, patogenicidade, tropismo tecidual e patologia); morfologia; propriedades físicas e químicas; proteínas; lipídeos; propriedades biológicas (hospedeiro, modo de transmissão no ambiente, distribuição geográfica, patogenicidade).

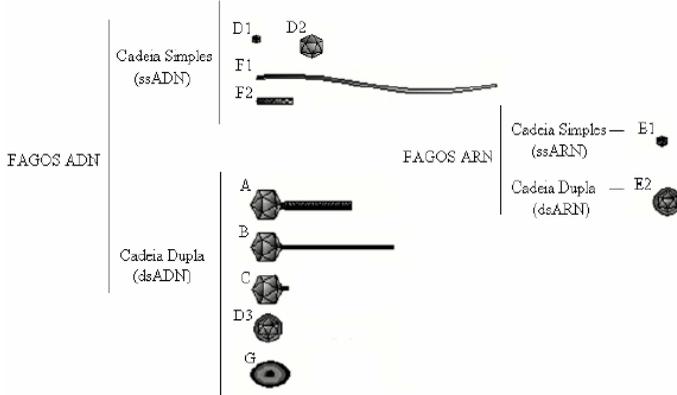
Por meio da análise morfológica ou genômica os bacteriófagos podem ser divididos em seis grupos, conforme o tipo morfológico, tipo de ácido nucléico e hospedeiro. Os fagos podem ser tanto de DNA (cadeia simples ou de cadeia dupla) ou RNA (cadeia simples ou de cadeia dupla).

Os fagos de DNA cadeia dupla podem ser: com cauda contrátil (A), com cauda não-contrátil (B), com cauda curta (C), sem cauda (D3) e pleomórficos, protegidos por um invólucro lipídico (G). Os fagos de DNA cadeia simples são diferentes, podendo ser icosaédricos (D1 e D2) ou filamentosos (F1 e F2). Já, os fagos de RNA são pertencentes ao grupo E, com forma icosaédrica, e podem ser de cadeia simples (E1) ou dupla (E2) (Figura 6).

O ICTV classifica os bacteriófagos em doze famílias, cujos morfotipos correspondentes são descritos por Ackermann; Eisenstarkq (1974): *Myoviridae* (A1 e A3), *Siphoviridae* (B1 e B3), *Podoviridae* (C1 e C3), *Microviridae* (D1), *Corticoviridae* (D3), *Tectiviridae* (D4),

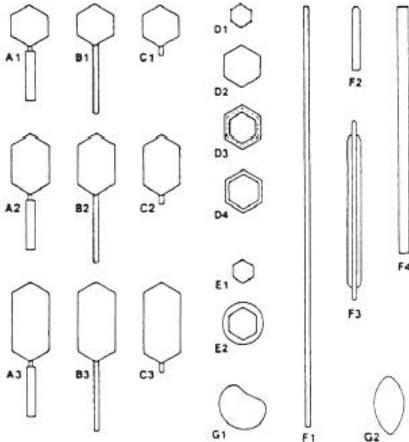
Leviviridae (E1), *Cytoviridae* (E2), *Inoviridae* (F1 e F2), *Lipothrixviridae* (F3), *Plasmaviridae* (G1) e grupo SSVI (G2). Os morfotipos D2 e F4 ainda não foram classificados em famílias (Figura 7).

Figura 6 - Classificação dos bacteriófagos com base na morfologia e no tipo de ácido nucléico



Fonte: ACKERMANN, 1992.

Figura 7 - Morfotipos de bacteriófagos



Fonte: DO VAL, 1997.

2.3.3.1 *Myoviridae*

A família *Myoviridae* da ordem *Caudovirales* é composta por sessenta e sete gêneros, os quais vinte e oito estão classificados em seis subfamílias e trinta e nove não possuem subfamília, sendo os principais: T4 vírus, P1 vírus, P2 vírus, Mu vírus, que infectam *Enterobacterias*; Spovirus, infeccioso para *Bacillus*, e o fago Myohalovirus, infectando *Halobacterium* φH (ICTV, 2016).

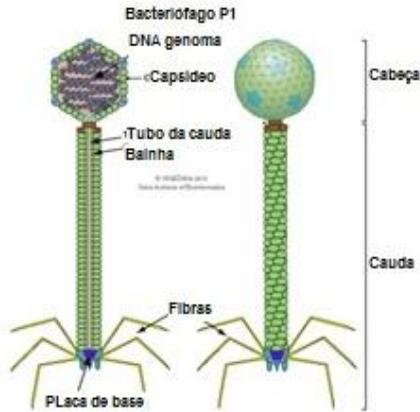
Os miofagos possuem cabeça com diâmetro variando de 50 nm a 100 nm e capsídeo constituído de 152 capsômeros, pescoço e cauda contrátil com comprimento entre 80 nm e 455 nm, quando estendida, e de 10 nm e 15 nm, quando contraída. A cauda possui seis longas fibras terminais, seis espículas curtas e uma placa basal (Figura 8). Possuem genoma de DNA de dupla fita linear entre 33,6 Kb e 170 Kb (ICTV).

O fago P1 possui um genoma de 93.601 pb, o qual contém pelo menos 117 genes, sendo que 45 genes codificam proteínas e 37 genes codificam o ciclo lítico (LOBOCKA et al., 2004).

O P1 infecta e pode causar a lise de *Escherichia coli*, sendo que as fibras terminais da cauda determinam a especificidade da adsorção de P1 em diferentes hospedeiros. As partículas infecciosas de P1 contém moléculas lineares de cadeia dupla. Após a injeção do DNA em uma célula hospedeira, ocorre recombinação para definir o ciclo fágico. A escolha entre os vários tipos de ciclos ocorre pela interação de vários fatores ambientais com sistema de defesa da célula hospedeira (SANDMEIER; ILDA; ARBER, 1992).

O P1 é um plasmídeo estável, mantido com cerca de uma cópia por cromossomo bacteriano, sendo que vários genes de P1 são expressos no estado lisogênico, contudo possui genes que são responsáveis pelas funções primárias, como a manutenção do plasmídeo e a inibição do desenvolvimento do ciclo lítico. Os genes envolvidos no ciclo lítico são os responsáveis pelo desenvolvimento do fago na replicação e na formação de partículas fágicas, incluindo embalagens de cabeça e finalmente na lise celular para libertar a progênie do fago (LOBOCKA et al., 2004).

Figura 8 - Bacteriófago P1



Fonte: VIRALZONE. Disponível em:

<http://viralzone.expasy.org/505?outline=all_by_protein>. Acesso em: 10 jul. 2017.

No que diz respeito a montagem de novas partículas virais, vale ressaltar que esta se dá pela formação independente das estruturas da cabeça, cauda e fibras que são posteriormente unidas. Sobre o capsídeo viral, este não é produzido diretamente no seu formato final, tendo em vista que proteínas internas de estruturação (*scaffolding*) preenchem o interior do capsídeo primário e são posteriormente expelidas através de seus orifícios, fazendo com que o capsídeo expanda até o formato definitivo, antes da entrada do DNA. A proteína *gp23* é uma das proteínas de estruturação (*scaffolding*) envolvidas nesse processo (KNIPE; HOWLEY, 2007).

Dentre os fagos marinhos, os membros da família *Myoviridae* são isolados com maior frequência que os demais (SULLIVAN; WATERBURY; CHISHOLM, 2003). Estes infectam uma vasta gama de bactérias, possivelmente por possuírem em seu DNA uma base diferenciada, a 5-hidroximetilcitosina, a qual garante ao DNA viral resistência a muitas enzimas de restrição do hospedeiro. Quando glicolisada, a 5-hidrometilcitosina confere ao DNA viral resistência a praticamente todas as endonucleases da célula hospedeira (MADIGMAN et al., 2010).

Os miofagos são geralmente líticos e podem rapidamente tirar proveito do aumento da população hospedeira, tendo em vista seu curto

tempo de geração e das altas taxas de replicação (MADIGMAN et al., 2010; SULLIVAN; WATERBURY; CHISHOLM, 2003).

2.3.4 Aplicações de bacteriófagos na indústria, medicina e biotecnologia

Atualmente, muitos pesquisadores acreditam no surgimento de uma "nova era na pesquisa de fagos", pelo fato de ter sido verificado que os bacteriófagos desempenham um papel importante na ecologia microbiana, influenciam a evolução de genomas bacterianos e podem fornecer ferramentas potenciais para enfrentar a crise de resistência a antibióticos na medicina (SULAKVELIDZE; ALAVIDZE; MORRIS, 2001). Um exemplo é o impacto dos fagos no ciclo da matéria orgânica na biosfera (BOYD; BRUSSOW, 2002).

A maior parte das pesquisas sobre o uso de bacteriófagos no controle microbiano ainda tem se concentrado no seu uso médico para tratar infecções específicas. A taxa de sucesso de muitos experimentos com pacientes, evidenciada pela recuperação parcial ou completa, chega a 92%. Sulakvelidze; Alavidze; Morris (2001) citam vários exemplos de aplicação médica bem-sucedida de fagos no tratamento de meningite cerebrospinal, infecções da pele e mucosas, infecções pulmonares e doenças inflamatórias urológicas, principalmente em hospitais do Leste Europeu.

Jensen et al. (2015) utilizam bacteriófagos no tratamento de pacientes contaminadas por *Staphylococcus aureus* multirresistentes (MRSA), tendo em vista que eles são altamente resistentes a antibióticos. O estudo tem alcançado resultados positivos.

Outras aplicações vão desde processos de desinfecção em plantas de tratamento de efluentes até o controle biológico de pragas bacterianas na agricultura, contudo, restrições regulatórias e falta de incentivos econômicos têm travado a expansão deste tipo de tecnologia em muitos países (SULAKVELIDZE; ALAVIDZE; MORRIS, 2001 e SABOUR; GRIFFITHS, 2010). Um exemplo do uso de bacteriófagos, já comercialmente disponível, é o produto “*AgriPhage*” (Omnilytics), um tratamento para pragas bacterianas em plantações de tomates e pimenta. Esse produto já foi, inclusive, aprovado para ser utilizado em cultivos orgânicos. Também há o “*ListShield*” (Intralytix), um coquetel de fagos com foco em reduzir ou eliminar o risco de veiculação de *Listeria monocytogenes* por alimentos (SABOUR; GRIFFITHS, 2010).

2.3.5 Bacteriófagos em poços de petróleo e gás

Durante o processo de extração de petróleo e gás ocorre a contaminação por hidrocarbonetos na água de drenagem, a qual precisa ser tratada e um dos métodos utilizados é a biorremediação.

Rosenberg et al. (2010) relataram que, durante a biorremediação realizada na água de drenagem de poços de petróleo, ocorreu uma conversão de 90% do substrato de carbono, superior ao esperado, porque as bactérias geralmente convertem de 40 a 60% deste substrato. O estudo revelou que os bacteriófagos interferem na biorremediação, demonstrando que a presença de fagos causa a lise celular das bactérias, seguida por degradação do composto bacteriano. Os vírus são responsáveis pela remoção de nitrogênio e fósforo presente no meio, ou seja, os bacteriófagos podem exercer um efeito positivo sobre a biorremediação, quando utilizados em culturas mistas, e um efeito prejudicial, quando usados como culturas puras (ROSENBERG et al., 2010).

Os bacteriófagos presentes em poços de petróleo e gás são encontrados em três famílias:

a) Myoviridae

Esta família inclui seis subfamílias e 1.200 membros com cauda contrátil, longa (80-455 x 16-20 nm) e complexa, consistindo de um tubo central envolto por uma bainha contrátil separada da cabeça por um pescoço. Apresentam capsídeos relativamente grandes. (ACKERMANN; BERTHIAUME; TREMBLAY, 1998).

b) Siphoviridae

Esta família inclui 2.500 membros, distribuídos em cinco gêneros, e tem como característica principal uma cauda não contrátil, longa de aproximadamente 65-570 x 7-10 nm e frequentemente flexível (ACKERMANN; BERTHIAUME; TREMBLAY, 1998).

c) Podoviridae

Inclui 700 membros, distribuídos em três gêneros, caracterizados pela cauda curta de aproximadamente 20 x 8 nm e não contrátil. (ACKERMANN; BERTHIAUME; TREMBLAY, 1998).

Embora os fagos estejam presentes nas águas dos poços de petróleo, existem poucos estudos, especialmente, avaliando a eficiência do uso de bacteriófagos no controle do *souring* devido a lise das células das BRS.

Kamimura e Araki (1989) detectaram bacteriófagos a partir de culturas puras de *Desulfovibrio salexigens*, alimentadas com água do mar. Após o isolamento e purificação dos bacteriófagos, foram

realizadas análises de microscopia eletrônica, análise do ácido nucleico e proteínas estruturais, através de coloração com alaranjado de acridina.

Eydal et al. (2009) isolaram fagos de *Desulfovibrio aespoensis* a partir de amostras de água de diferentes poços de extração de petróleo, usando o método padrão do número mais provável (NMP). Foram isolados 5 tipos de fagos diferentes, denominados pelos pesquisadores: Hey1, Hey2, Hey3, Hey4 e Hey5, todos pertencentes a família *Podoviridae*.

Para descobrir o espectro de hospedeiros dos fagos isolados, foram utilizadas seis espécies diferentes de *Desulfovibrio*, os quais foram submetidos à infecção pelos 5 fagos. O *D. aespoensis* foi o único hospedeiro infectado, revelando a especificidade parasita-hospedeiro. Eydal et al. (2009) sugeriram que a especificidade dos fagos pode ser minimizada através da utilização de um fago de espectro ampliado de hospedeiros ou um coquetel de fagos (mistura de fagos).

Sillankorva; Neubauer; Azeredo (2010) expuseram duas espécies formadoras de biofilme, *Pseudomonas fluorescens* e *Staphylococcus lentus* (em sua maioria *S. lentus*), ao fago FIBB-PF7A que é específico apenas para *P. fluorescens*. O fago infectou seu hospedeiro, danificando parcialmente a estrutura do biofilme e liberando as células da outra espécie não suscetível a ele para a fase planctônica. A partir da mudança – do biofilme para o meio livre – o tratamento com biocida comum torna-se mais efetivo, eliminando o restante dos microrganismos. Considerando que os biofilmes correspondem a formação microbiana mais comumente encontrada nos reservatórios de petróleo e gás, sendo formados por diferentes espécies bacterianas, a especificidade de fagos para o hospedeiro pode ser uma desvantagem. No entanto, estudos têm demonstrado que fagos de menor especificidade (polivalentes) podem erradicar eficazmente filmes bacterianos (SILLANKORVA; NEUBAUER; AZEREDO, 2010; AZEREDO e SUTHERLAND, 2008).

Até o momento, as técnicas mais utilizadas de isolamento de bacteriófagos se limitam àqueles com espectro restrito de hospedeiros, de modo que na área ambiental se faz necessário o desenvolvimento de técnicas de isolamento de fagos polivalentes, em especial, quando se trata de sua aplicação em reservatórios de petróleo e gás, cuja gama de microrganismos sobre os quais se deseja ter o controle microbiológico é grande, além disso, nesses locais há grande tendência de formação de biofilmes.

Existe um pedido de patente registrado nos Estados Unidos da América com o objetivo de patentear a técnica de controle de acidificação dos poços de petróleo e gás (*souring*), causado por BRS,

através da inoculação de bacteriófagos virulentos que infectam *D. vulgaris* (BALDWIN; SUMMER, 2017).

2.3.6 Métodos de detecção de bacteriófagos em amostras de água

Ainda não foi estabelecida uma metodologia específica para o estudo de fagos presentes em amostras de água oriundas de poços de petróleo. Embora as amostras tenham uma composição complexa, alguns estudos foram realizados aplicando-se os métodos amplamente utilizados na área de ecologia de vírus em ambientes aquáticos.

Ocorre, porém, a necessidade de uma etapa anterior aos métodos de detecção, que é a concentração viral para obtenção da concentração necessária de material genético suficiente para a realização das técnicas moleculares (GIMENES, 2010).

Amostras de água precisam passar primeiramente por um processo de clarificação, como filtração, para remoção de material particulado e células bacterianas e, então, os vírus presentes são concentrados por diferentes técnicas: filtração (PAUL et al., 1991; SUTTLE; CHAN; COTTRELL, 1990; WOMMACK; HILL; COLWELL, 1995; LARSEN et al., 2008), ultracentrifugação (SHORT; SHORT, 2008) ou ainda através da combinação das técnicas entre si (MEHNERT; STEWIEN, 1993; LARSEN et al., 2001). Na Tabela 3, estão apresentadas as principais técnicas de concentração viral em amostras ambientais.

A escolha pela melhor técnica é definida pelo tipo de amostra — propriedades macromoleculares das proteínas virais, afinal, as partículas virais apresentam polaridade, a qual permite sua adsorção a uma ampla variedade de matrizes carregadas como, por exemplo, membranas, extrato de carne — pela infraestrutura e disponibilidade financeira do laboratório e até mesmo pelo *know-how* do grupo de pesquisa onde o trabalho será realizado (BOSCH et al., 2008; WYN-JONES; SELLWOOD, 2001).

O método de ultracentrifugação consiste na utilização de força gravitacional superior a 100.000 \times *g* por 1 hora para possibilitar a sedimentação de partículas virais. A desvantagem desse método é a concentração de pequenos volumes, sendo indicado para a segunda etapa de concentração (MEHNERT et al., 1997; WYN-JONES; SELLWOOD, 2001).

Já, o método de concentração viral por adsorção/eluição a sais baseia-se na propriedade dos vírus de adsorverem eletrostaticamente a estas substâncias, tais como: o óxido de ferro, fosfato, hidróxido de

alumínio, extrato de carne ou carvão ativado (FON; LIPP, 2005; WYN-JONES; SELLWOOD, 2001; SEELEY; PRIMOSE, 1982).

Os métodos mais utilizados para a concentração de vírus baseiam-se na adsorção das partículas virais a filtros de microporosidade, carregados eletricamente, e posterior eluição com pequenos volumes (BOSCH et al., 2008). O método Viradel (*virus-adsorption-elution*) vem sendo recomendado desde a 14ª edição do *Standard Methods for Evaluation of Water and Wastewater* (APHA; WWA; WEF, 1976) e para muitos autores ainda é considerada a melhor alternativa para a concentração de vírus presentes e amostras ambientais (GARRAFA, 2009; BOSCH et al., 2008; HILL et al., 2009).

O uso de membranas ou cartuchos carregados negativamente tem o inconveniente de que as amostras de água devem ser previamente ajustadas, ou seja, a água tem que ser acidificada e, muitas vezes, sais precisam ser adicionados para facilitar a adsorção dos vírus aos filtros eletronegativos. Isso ocorre porque a maioria dos vírus entéricos são carregados negativamente no pH do meio ambiente (BOSCH; ABAD; PINTÓ, 2005).

Sobsey e Jones (1979) desenvolveram um método, utilizando filtro de celulose e terra de diatomáceas, carregado positivamente para concentração de poliovírus. A eficiência de recuperação desse método é comparável ao do método da filtração através de filtros de carga negativa, contudo, a adsorção das partículas virais à superfície do filtro ocorre em um intervalo amplo de pH, sem a necessidade de aplicação de sais (ESTES et al., 1979; RAO; METCALF; MELNICK, 1986).

Vários pesquisadores utilizaram o novo método e comprovaram a sua eficiência com uma recuperação de 50% de enterovírus de águas cloradas e de esgoto (CHANG; FARRAH; BITTON, 1981; SOBSEY; GLASS, 1980; SOBSEY; JONES, 1979) e de 22% a 50% na recuperação de poliovírus de água potável (SOBSEY; JONES, 1979).

Shields e Farrah (1986) demonstraram em seus estudos que os bacteriófagos são sensíveis a pH extremos, assim, as técnicas empregando o uso de membranas carregadas negativamente são inviáveis. Sugere-se, então, o uso de membranas carregadas positivamente, e para aumentar a eficiência na eluição tem sido utilizado solução proteica a base de extrato de carne. Na recuperação viral de bacteriófagos T4 em solo utilizando-se extrato de carne como eluente, o índice de recuperação foi de 16% (WILLIAMSON; WOMMACK; RADOSEVICH, 2003).

Tabela 3 - Resumo das principais técnicas de concentração de vírus em amostras ambientais

Técnica	Método	Tipo de água	Vol. inicial (L)	Quant. inicial de vírus	Recupe-ração	Custo	2ª etapa	Comentário
Adsorção/ eluição	Chumaço de gaze	Esgoto	Grande	Alta	Baixo para médio	Nulo	Não	Não quantitativo
	Membrana eletronegativa	Todas	1-1000	Baixa/média	50-60% com prática	Médio	Sim	Necessários grandes volumes de água e bombas dosadoras
	Membrana eletropositiva	Todas	1-1000	Baixa/média	50-60% com prática	Médio	Sim	Não necessita de pré-requisito
	Cartuchos eletronegativos	Baixa turbidez	1-50	Baixa/média	Variável: alta em águas limpas	Baixo	Sim	Podem entupir mais rapidamente que as membranas
	Cartuchos eletropositivos	Todas	1-1000	Baixa/média	Variável	Médio	Sim	Ampla gama de vírus
	Lã de vidro	Todas	1-1000	Baixa-média	Variável	Baixo	Sim	Não necessita de pré-requisito
	Vidro em pó	Todas	< 100	Indiferente	20 – 60%	Médio	Sim, quando Vol. > 100L	Aparelhos especiais
Ultra-filtração	Membranas de alginato	Limpa	Baixo	Boa	Baixa	Baixo	Não	Muito lento. Pode entupir rapidamente com amostras turbidas
	Membrana simples	Limpa	Baixo	Indiferente	Variável	Médio	Não	Lento

(continua)

	Fluxo tangencial e fibras ocas	Efluente tratado	Alto	Baixa	Variável	Alto	Não	(conclusão) Necessita de pré-filtros para águas túrbidas
Ultracentrifugação	Limpas	Limpo	Baixo	Alta	Média	Alto	Não	Vasta gama de vírus, apresenta boa recuperação para amostras limpas, entretanto requer tempo e apresenta alto custo
Imunoafinidade	Imunoafinidade e esferas magnéticas	Descolecido	Baixa	Baixa	Boa recuperação para volumes pequenos	Alto	Não	Requer ensaio específico para cada vírus. Poucos dados na literatura

FONTE: BOSCH et al. (2008), WYN-JONES; SELLWOOD (2001), adaptado de GARRAFA (2009).

A detecção de vírus e bacteriófagos em amostras aquáticas pode ser realizada através dos seguintes métodos: ensaios de placa (técnica do plaqueamento); método do número mais provável (NMP); microscopia eletrônica de transmissão; microscopia de epifluorescência e citometria de fluxo (SUTTLE, 2007).

O método tradicional de plaqueamento é realizado em meio sólido, contendo uma mistura de células hospedeiras e bacteriófagos de interesse em suspensão com meio nutritivo (ágar), então observa-se a formação de placas de lise celular (Figura 9). Já, o método do número mais provável é utilizado para analisar o número de unidades formadoras de placas, para o caso de células que são cultiváveis apenas em meios líquidos (SUTTLE, 2007).

As técnicas de plaqueamento e do número mais provável são de suma importância para se determinar a capacidade de virulência do vírus — qual título, qual a concentração viral expressa em unidades formadoras de placa por volume, sendo o inverso da última diluição na qual é possível contar/visualizar placas de lise por volume de inoculo —, a abundância viral e isolar bacteriófagos específicos. Porém, quando se trata BRS, depara-se com a dificuldade de cultivá-las por serem bactérias anaeróbias, assim é necessário criar um sistema de cultivo das células na ausência de oxigênio (SUTTLE, 2007; MADIGMAN et al., 2010).

Figura 9 - Placas de lise celular causadas por bacteriófagos



Fonte: ASM, 2015.

Outra técnica muito utilizada é a Microscopia eletrônica de transmissão (MET). Ela é utilizada para análise morfológica e da abundância dos bacteriófagos (TYUTIKOV, et al. 1980; SUTTLE, 2007). Essa técnica exige a ultracentrifugação e coloração da amostra, tendo como vantagem que partículas semelhantes às virais podem ser identificadas e quantificadas (SUTTLE, 2007), e a desvantagem é o preparo da amostra e a necessidade de um microscópio eletrônico (NOBLE; FUHRMANN, 1998).

A técnica de microscopia eletrônica de transmissão vem sendo substituída pelo método detecção que utiliza a microscopia de epifluorescência, exceto quando é necessário analisar a morfologia da partícula viral. Na microscopia de epifluorescência, as partículas virais são concentradas com a utilização de membranas e são coradas com corante fluorescente (SUTTLE, 2007). A coloração fluorescente pode ser obtida utilizando SYBR Green ou SYBR Gold.

Noble e Fuhrman (1998) desenvolveram o método SYBR Green I, que consiste em utilizar o reagente SYBR I diluído com água deionizada filtrada. Uma gota dessa solução de coloração é inserida sobre uma placa de Petri com um filtro sobre a gota e, então, deixa-se o material em repouso por 15 minutos no escuro. Após esse tempo, as

lâminas são preparadas e por último é realizada a contagem no microscópio invertido de epifluorescência onde observa-se o verde brilhante. É possível, nesse processo, distinguir células bacterianas de bacteriófagos, devido ao tamanho e brilho, pois as células bacterianas são maiores que os fagos (Figura 10).

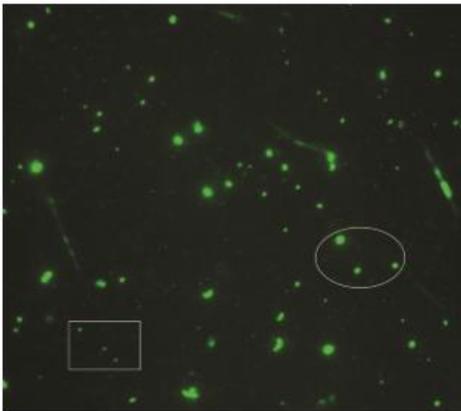
Suttle (2005) ressalta que a problemática desse método é que muitas amostras foram coradas e armazenadas de forma errada, assim grande parte dos resultados encontrados na literatura são subestimados.

Shibata et al. (2006) compararam os dois tipos de coloração e observaram que, quando as bactérias e vírus foram submetidos à coloração SYBR Gold, a fluorescência emitida durou mais tempo do que quando corado com SYBR Green I, comprovando o estudo realizado por Chen et al. (2001).

O método de citometria de fluxo é utilizado para quantificar as partículas virais e diferenciar as classes virais presentes nas amostras, por meio da fluorescência emitida. Tal método permite a análise de um grande número de amostras simultâneas e de forma rápida (SUTTLE, 2007).

Vários grupos de pesquisadores têm aplicado essas metodologias no estudo da diversidade dos fagos presentes nas águas dos poços de petróleo.

Figura 10 - Imagem de microscopia de epifluorescência



Fonte: ROSENBERG et al. 2010.

Legenda: No círculo demonstra a presença de bactérias e no quadrado a presença de partículas virais.

As metodologias disponíveis aplicadas em geral para pesquisa de fagos em ecossistemas aquáticos, também vêm sendo aplicadas ao estudo da diversidade dos fagos presentes nas águas dos poços de petróleo.

Eydal et al. (2009) detectaram bacteriófagos em poços de petróleo e gás, isolando, primeiramente, BRS de diferentes locais do poço, utilizando a técnica do número mais provável (NMP). Para isso, foram isolados quatro diferentes BRS, as quais foram utilizadas para detectar o número de vírus virulentos e os bacteriófagos presentes. As BRS foram identificadas pela sequência do gene 16S rRNA. Além disso, as sequências genômicas de enterobactérias foram amplificadas por *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequences* (ERIC-PCR). Os bacteriófagos foram isolados a partir de culturas de *D. aespoeensis* infectadas. Para determinar o número total de partículas virais presentes nas amostras, utilizou-se a contagem direta, por meio do método SYBR Gold (NOBLE; FUHRMAN, 1998; Chen et al. 2001).

Para descobrir o espectro de hospedeiros dos bacteriófagos isolados foram utilizadas seis espécies diferentes de *Desulfovibrio*, as quais foram submetidos à infecção pelos cinco bacteriófagos, através de três métodos distintos para análise da lise celular, e foram comparados com culturas de *D. aespoeensis* sensíveis aos bacteriófagos (EYDAL et al., 2009). Para Summer et al. (2011), que também isolaram bacteriófagos após o isolamento de BRS, o estudo revelou a facilidade em que os bacteriófagos foram isolados utilizando culturas mistas de enriquecimento.

Rosenberg et al. (2010) utilizaram a técnica de SYBR Gold, de acordo com Noble e Fuhrman (1998), para a contagem total de bactérias e de bacteriófagos presente nos reatores de biorremediação. Então, eles realizaram o cultivo de linhagens puras das bactérias de maior frequência no reator *Marinobacter* sp., *Winogradskyella proferorum* e *Pseudomonas* sp, as quais foram identificadas pela sequência do gene 16S rRNA para realizar o isolamento de bacteriófagos.

Os métodos de biologia molecular, como PCR, vêm sendo utilizados com sucesso na virologia ambiental desde a década de 90 (ABBASZADEGAN et al., 1993, GAJARDO et al., 1995, FONG; LIPP, 2005), tendo como vantagem possibilitar a amplificação e a detecção de pequenas quantidades virais, as quais os métodos tradicionais não seriam capazes de detectar, uma vez que uma cópia do genoma viral é suficiente (BUESA et al., 1996). Segundo Bosch et al. (2008), a técnica de PCR é, ainda, hoje, considerada a melhor para detecção viral.

A técnica de PCR tem como limitação a não diferenciação entre partículas virais infecciosas e não infecciosas, o que tem levado ao emprego dessa técnica em conjunto com técnicas de cultura celular (CARTER, 2005).

Tratando-se de poços de petróleo e gás, há poucos estudos sobre o processamento das amostras e detecção de bacteriófagos, já, no que se refere ao uso de técnicas de biologia molecular, como PCR ou metagenômica, não há relatos, ainda, na literatura.

Assim, é de suma importância o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular para o isolamento de bacteriófagos, uma vez que a aplicação de fagos para o controle microbiológico de BRS irá auxiliar no controle do *souring* nos reservatórios de petróleo e gás e, conseqüentemente, aumentará a produção e reduzirá os impactos ambientais.

Considerando as limitações laboratoriais para cultivo de bactérias redutoras de sulfato e conseqüente detecção de fagos pelos métodos convencionais, o presente estudo tem por objetivo estabelecer uma metodologia para detecção de bacteriófagos de BRS. Em se tratando de amostras ambientais complexas, em termos de composição, inicialmente avaliou-se a eficiência de um processo de concentração de fagos, seguida da avaliação do método de amplificação gênica em seus diversos aspectos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

As determinações analíticas dos reatores foram realizadas no Laboratório de Tratamento de Efluentes Biológicos (LTBR), na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Já os ensaios microbiológicos foram realizados no Laboratório de Vírus Entéricos do Departamento de Microbiologia, no Instituto de Ciências Biomédicas II, da Universidade de São Paulo (ICB II/USP).

3.1 OPERAÇÃO DOS REATORES

3.1.1 Procedência

A matriz do presente estudo é um consórcio microbiano oriundo da água de produção de um reservatório de petróleo, o qual é operado em *offshore* e alimentado como meio para crescimento de bactérias sulfito-redutoras (BRS) e nitrato-redutoras (BRN). Esse consórcio vem sendo alimentado desde 2007. O sistema foi disposto em dois reatores com volume útil de 10 litros e operado em regime de batelada alimentada.

3.1.2 Manutenção do sistema

A alimentação dos reatores é composta de água do mar sintética (Tabela 4), acrescida de uma solução de elementos traços (Tabela 5). A alíquota de água do mar a ser utilizada foi enriquecida no momento de uso com 130 mg.L^{-1} de acetato de sódio, 30 mg.L^{-1} de propionato de cálcio e $26,66 \text{ mg.L}^{-1}$ de nitrato.

A relação entre carbono-nitrogênio (C:N) nessas condições é igual a 4,6:1, sendo superior à relação C:N de 1,4:1 obtida da estequiometria proposta para a desnitrificação (MATEJU et al., 1992).

A composição da água do mar sintética foi definida com base em informações da composição iônica da água do mar e do local de procedência do poço de petróleo. E, no que diz respeito aos parâmetros, buscou-se utilizar os definidos por Tang; Baskaran; Nematí (2009), MYHR et al. (2002), KASTER et al. (2007) (Tabela 6).

Tabela 4 - Composição da água do mar sintética

Componente	Quantidade (g.L⁻¹)
KH ₂ PO ₄	0,088
Na ₂ SO ₄	4,408
NaCl	24,861
MgCl ₂ .6H ₂ O	9,786
KCl	0,820
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,588
NaHCO ₃	0,198
KBr	0,076
KI	0,013
F ₂ SO ₄ .7H ₂ O	0,025
SrCl ₂ .6H ₂ O	0,030
Solução elementos-traço	1 mL.L ⁻¹

Fonte:

Tabela 5 - Solução de elementos-traço

Componente	mg. L⁻¹
CuSO ₄ .5H ₂ O	5
H ₃ BO ₃	10
MnSO ₄ .5H ₂ O	10
ZnSO ₄ .7H ₂ O	70
MoO ₃	10
Água destilada	1 L

Fonte: MYRH et al., 2002.

Tabela 6 - Composição iônica da água do mar

Íons	Quantidade (g.L ⁻¹)
Na	11,500
K	0,458
Ca	0,433
Mg	1,170
Fe	0,005
Sr	0,001
Cl	20,300
SO ₄	2,990
HCO ₃	0,144
Br	0,051
Iodo	0,010
Boro	0,017
O ₂	Não fornecido (estimado 8 mg.L ⁻¹)
PO ₄	Não fornecido (estimado 0,062 mg.L ⁻¹)
P	Não fornecido

Fonte: Dados fornecidos pela Petrobras.

Para alimentação do sistema, um volume de 1,5L de água foi retirado de cada reator e mantido em repouso por 48 horas, em temperatura ambiente, para decantação dos sedimentos. Após esse período, 1L da amostra foi retirado e descartado. Um volume de 500 mL do sedimento decantado foi reservado para posterior inoculação no reator.

O volume do reator foi recomposto logo em seguida, com uma solução composta por 500 mL de água do mar sintética e suplementada com 25 mL de acetato de sódio, 25 mL de propionato de cálcio e 25 mL de nitrato, após ajuste do volume para 1 L com água destilada, foi aplicado gás Argônio para retirada do oxigênio.

A cada inoculação da solução de alimentação e do sedimento no reator foi necessário retirar 1,5 L do reator. Esse processo era repetido a cada 48 horas para os dois reatores.

3.2 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

3.2.1 Cromatografia de íons

Seguindo os métodos preconizados por CAMACHO (2015), as análises cromatográficas foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo de íons ICS 5000 (Dionex), equipado com dos sistemas cromatográficos em paralelo, para detecção amperométrica e condutivimétrica.

As amostras foram coletadas dos reatores, filtradas em membrana de 0,22 μm e armazenadas em frascos de vidros a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$. No momento de injeção, as amostras foram diluídas 200 vezes com água ultrapura, para quantificação do sulfeto, e 80 vezes para determinação dos demais íons.

Para determinação da concentração de acetato, propionato e nitrato foram realizadas análises utilizando-se detecção condutivimétrica com supressão eletrolítica. A água ultrapura foi utilizada como eluente externo, e o hidróxido de potássio (KOH) como eluente interno.

Para separação dos íons, utilizou-se coluna capilar IonPac AS18-Fast (0,4 x 150 mm) e pré-coluna IonPac AG18-Fast (0,4 x 35 mm), ambas da Dionex, com volume de injeção de 0,4 μL e vazão do eluente externo de 0,012 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A temperatura utilizada na coluna e detector foi de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente. As condições estabelecidas para separação dos íons de interesse foram consideradas da seguinte forma:

0 a 5 minutos – isocrático a 1,5 mM

5 a 16 minutos – gradiente de 1,5 a 50 mM

16 a 18 minutos – isocrático a 50 mM

18 a 19 minutos – gradiente de 50 a 1,5 mM

19 a 35 minutos – isocrático a 1,5 mM

Para determinação da concentração de sulfeto, foi utilizada a detecção amperométrica. Nesse caso foi utilizado um único eluente, uma solução composta de acetato de sódio (400 mM) e hidróxido de sódio (200 mM) com vazão de 0,4 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Os íons foram separados utilizando-se coluna do tipo IonPac AS7 (2 x 250 mm) e pré-coluna IonPac AG7 (2 x 50 mm), ambas da Dionex com volume de injeção de 10 μL . A temperatura da coluna foi de $40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.2 Determinação de Sólidos Suspensos Totais (SST), Sólidos Suspensos Fixos (SSF) e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)

A concentração de biomassa foi estimada através da determinação da concentração de SSV (APHA; WWA; WEF, 1995),

com modificação do protocolo originalmente descrito para utilização de forno micro-ondas para secagem das amostras (TEIXEIRA; SCHMIDELL; ZDRADEK, 2008).

A concentração de SST foi determinada após filtração de uma alíquota de 100 mL de cada amostra, através de membrana de acetato de celulose com poro de 0,2 µm de diâmetro (Sartorius Stedim Biotech), seguida de secagem em micro-ondas por 15 minutos com 20% de potência. A seguir, as amostras foram calcinadas em mufla por 1 hora a 550 °C para a queima da fração orgânica e a determinação de SSF. A concentração de SSV foi estimada pela diferença entre a concentração de SST e SSF.

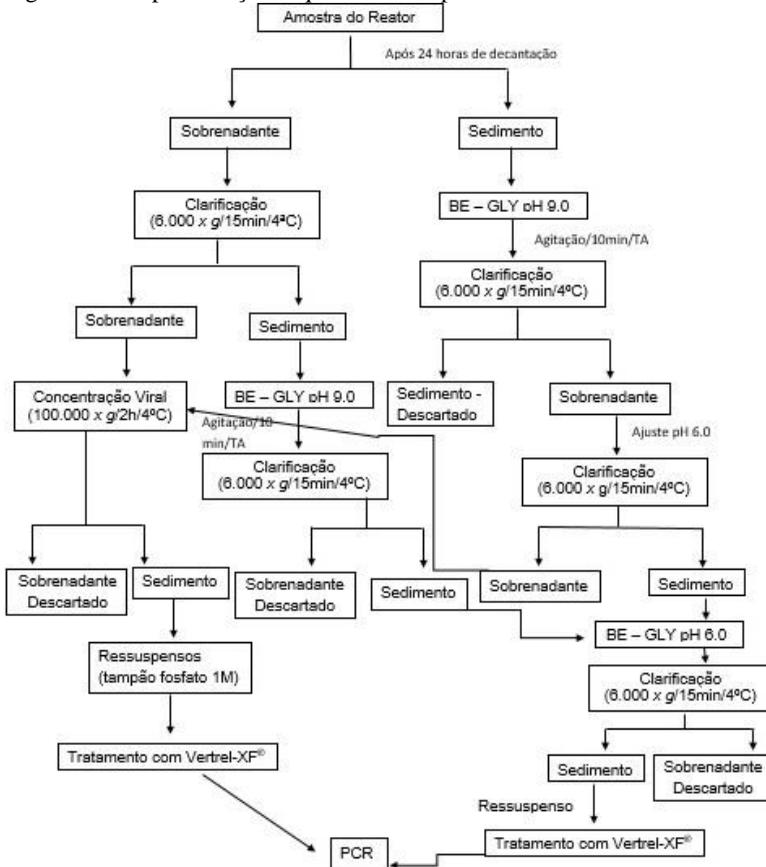
3.3 AMOSTRAGEM

Para realização do presente estudo foram coletadas amostras dos reatores em dezembro de 2016, sendo coletado um volume de 1 L dos reatores e 100 mL do sedimento, após decantação de 48 horas. O procedimento foi idêntico para o reator 1 e reator 2.

3.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras foram transportadas e processadas no Laboratório de Vírus Entéricos Humanos e Animais, ICBII/USP, sob refrigeração e mantidas 24 horas a 4 °C para decantação do sedimento. As duas frações, o sedimento e o sobrenadante, foram tratados separadamente (Figura 11).

Figura 11 - Representação esquemática do processamento da amostra



Fonte: Elaboração da autora, 2017.

3.4.1 Processamento do Sedimento

O sedimento, pesando aproximadamente 15g, foi ressuspenso em solução de 200 mL de extrato de carne 3%-glicina 0,5M e pH9,0 (BE-GLY), sob agitação magnética constante por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a mistura foi clarificada por centrifugação a 6.000 \times g por 15 minutos a 4 °C. O sedimento resultante da centrifugação foi pesado novamente e descartado.

O sobrenadante teve o seu pH ajustado para 6,0, utilizando-se solução de hidróxido de sódio 6M. O processo de clarificação foi repetido dando origem ao sobrenadante, o qual foi armazenado a 4 °C

para processamento futuro, e ao sedimento ocorreu a adição dos sedimentos oriundos do processamento do sobrenadante (item 3.4.2), desde que fossem da mesma amostra.

Sobre o sedimento foi adicionado extrato de carne 3%-glicina 0,5M e pH6.0 (BE–GLY) e repetiu-se o processo de clarificação. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspense em tampão fosfato 1M pH 7,5, em um volume calculado para obtenção de um fator de concentração de 100 vezes.

3.4.2 Processamento do Sobrenadante

O sobrenadante primeiramente passou pelo processo de clarificação a 6.000 $x g$ por 15 minutos a 4 °C em centrífuga refrigerada (HettichEba 12R). O sedimento foi tratado com extrato de carne (BE – GLY) 3% e pH 9.0 e mantido sob agitação magnética constante por 10 minutos à temperatura ambiente. Então, repetiu-se o processo de clarificação, no qual o sobrenadante foi descartado e o sedimento passou pelo processo descrito no item 3.4.1.

O sobrenadante, originado da primeira clarificação, e o sobrenadante, resultante do processo descrito no item 3.4.1, foram misturados e ultracentrifugados, a 100.000 $x g$ por 2 horas a 4 °C, para concentração viral em ultracentrífuga Optima XPN (Beckman®), utilizando rotor SW-28 (MEHNERT e STEWIEN, 1993) (Figura 11).

Após a concentração viral, o sobrenadante foi desprezado e os sedimentos ressuspensos em tampão fosfato 1M pH 7,5, em um volume calculado para obtenção de um fator de concentração em torno de 300 vezes.

3.4.3 Tratamento das amostras com Vertrel-XF®

As amostras foram submetidas ao tratamento com Vertrel-XF (1, 1, 1, 2, 3, 4, 4, 5, 5, 5, 5, 5 – decafluoropentano, Clarus®, Hortolândia, SP), com o intuito de redução de proteínas e lipídios (Queiroz *et al*, 2001).

Uma alíquota de 500 μL de amostra foi misturada com 500 μL de Vertrel-XF® e homogeneizadas em agitador magnético Genie 2® (Fisher Vortex) por 5 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 4.000 $x g$ por 10 minutos em centrífuga para microtubos 5415C (Eppendorf®). O sobrenadante foi removido e reservado, mas a interfase com os resíduos e a fase inferior, contendo o Vertrel-XF®, foram descartados.

O procedimento foi repetido 2 vezes e as amostras foram estocadas a -20 °C até o momento de uso.

3.5 CULTURA BACTERIANA

3.5.1 Linhagem Bacteriana

Bactérias *E.coli* da linhagem MG1655, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Beny Spirado do Laboratório de Genética Bacteriana (ICBII/USP), foram cultivadas e utilizadas em todos os ensaios com vírus bacteriófagos.

Para manutenção, a cultura de *Escherichia coli* foi cultivada em placa de Petri de 65 mm, contendo meio LB (Life Technologies) acrescido de ágar (Acumedia), conforme descrito no Anexo A. As bactérias semeadas foram incubadas a 37 °C por 12 horas em estufa e, então, armazenadas a 4°C. Os subcultivados bacterianos foram realizados quinzenalmente.

3.6 CULTIVO VIRAL

3.6.1 Protótipo Viral

O vírus bacteriófago P1 da família *Myoviridae*, cedido gentilmente pelo Prof. Dr. Benny Spira do Laboratório de Genética Bacteriana (ICBII/USP), foi utilizado como protótipo em todos os ensaios.

Dentre os fagos marinhos, os membros da família *Myoviridae* são isolados com maior frequência que os demais, motivo pelo qual essa família foi escolhida para realização do presente estudo (SULLIVAN; WATERBURY; CHISHOLM, 2003).

3.6.2 Preparo das suspensões dos protótipos virais

3.6.2.1 Lisado viral

A *E. coli* foi cultivada em meio LB (Anexo B) por 18 horas. Em seguida, foi realizado o subcultivo da bactéria na proporção de 1:100 em 10mL em meio LB-Composto (Anexo C). O crescimento bacteriano foi acompanhado por medições de OD na absorvância de 600nm (OD₆₀₀), em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech Uttospec 1000). Ao atingir o

valor na faixa de 0,3 a 0,5 OD₆₀₀, foi inoculada uma alíquota de 200 µL da suspensão de bacteriófago P1.

A cultura foi incubada a 37 °C, sob agitação a 250 rpm, em *shaker*, por aproximadamente 3 horas. Quando a lise foi observada, foram adicionados 100 µL de clorofórmio e a mistura novamente agitada no *shaker* por 5 minutos. A mistura foi centrifugada a 9.500 *x g* por 10 minutos a 4 °C. O sedimento foi descartado e o sobrenadante acondicionado em um novo tubo, sendo acrescido 10 µL de clorofórmio. A alíquota foi armazenada a 4 °C até o momento de uso.

3.6.2.2 Concentrado viral

O protótipo viral P1, obtido do item 3.6.2.1, foi concentrado por ultracentrifugação a 100.000 *x g* por 2 h a 4 °C, em ultracentrífuga Optima XPN (Beckman®) utilizando rotor SW-28 (MEHNERT e STEWIEN, 1993).

Após a ultracentrifugação, o sobrenadante foi desprezado e os sedimentos ressuspensos em tampão fosfato 1M pH 7,5, em um volume calculado para obtenção de um fator de concentração de 300 vezes. O material foi então armazenado a 4 °C até o momento de uso para as análises moleculares.

3.6.2.3 Titulação do protótipo viral

Para a titulação do protótipo, uma cultura de *E.coli* foi cultivada, conforme descrito no item 3.5.1. Foram preparadas placas de Petri contendo meio LB-Ágar (Anexo A), sobre as quais foram vertidos 5 mL do Top-Ágar (Anexo D) misturado com 200 mL *E.coli*.

Diluições seriadas de fator 10 do protótipo viral P1 variando de 10⁻¹ a 10⁻¹⁰ foram preparadas utilizando solução salina 0,9% de NaOH. Volumes de 10 µL de cada diluição foram adicionados na respectiva demarcação na placa de Petri. As placas foram incubadas em estufa a 37°C de 6 a 12 horas.

O título foi determinado matematicamente segunda a equação:

$$\text{UFP}/10 \mu\text{L} = \text{Média UFP}/10 \mu\text{L} \times \text{Fator de diluição} \quad (1)$$

Onde:

UFP: Unidades Formadoras de Placas

Para as amostras concentradas por ultracentrifugação o título foi calculado matematicamente pela equação:

$$\text{UFP}/10 \mu\text{L} = \frac{\text{UFP}/10 \mu\text{L} \times \text{fator de diluição} \times \text{fator de correção do}}{\text{volume}} \quad (2)$$

Onde:

UFP: Unidades Formadoras de Placas

Os resultados foram expressos em unidades formadoras de placa por volume (UFP/ μL).

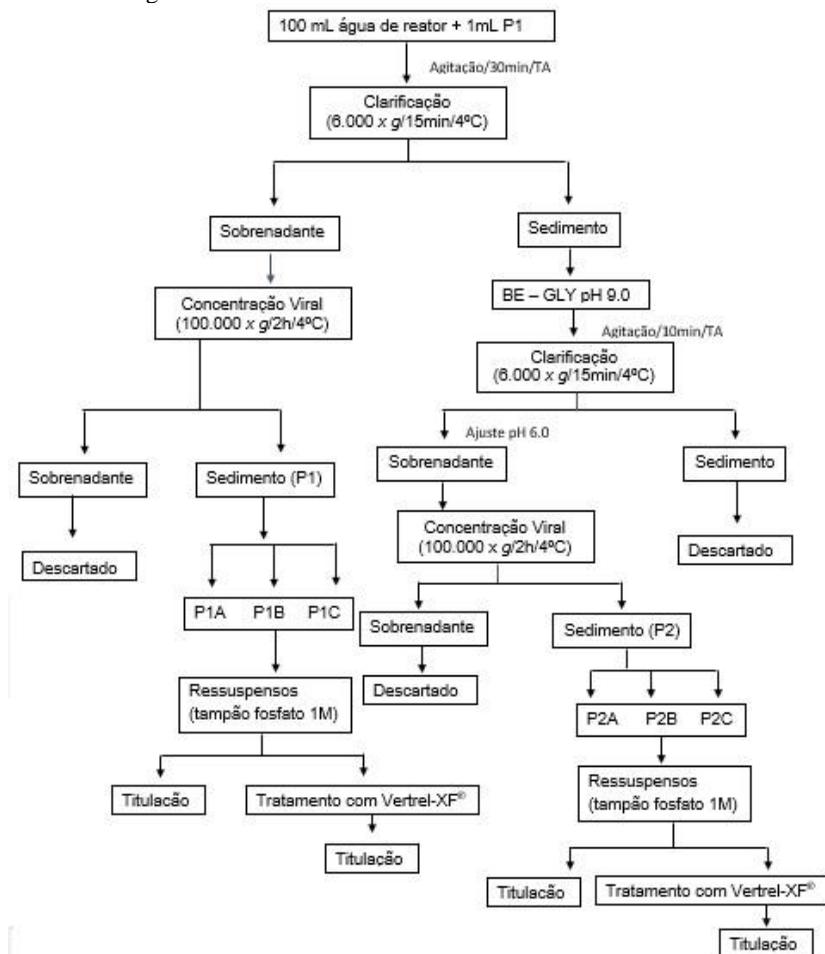
3.7 AVALIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO VIRAL EM AMOSTRAS DE ÁGUA DO REATOR

3.7.1 Semeadura Experimental

Três amostras de água coletadas do reator, contendo um volume de 100 mL cada, foram semeadas com 1 mL de suspensão de fago P1, contendo 5×10^5 UFP/mL, e mantidas sob agitação magnética constante por 30 minutos à temperatura ambiente. Esse processo está ilustrado na figura 12.

Em seguida, as amostras foram clarificadas por centrifugação a $6.000 \times g$ por 15 minutos a 4°C . O sobrenadante foi estocado a 4°C para posterior processo de concentração viral, originando as amostras P1A, P1B e P1C.

Figura 12 - Representação esquemática da avaliação de recuperação viral em amostras de água do reator



Fonte: Elaboração da autora, 2017.

O sedimento obtido após clarificação foi tratado com extrato de carne (BE – GLY) para eluição viral. Um volume de 30 mL de extrato de carne 3% - Glicina 0,5M pH 9.0 foi adicionado ao sedimento e a mistura mantida sob agitação magnética constante por 10 minutos à temperatura ambiente. A mistura foi clarificada, conforme descrito no item 3.4.1. O sedimento foi descartado, o sobrenadante transferido para um novo tubo e o pH ajustado para 6.0 e, então, armazenado a 4 °C, para

posterior processo de concentração viral. Essas amostras foram denominadas P2A, P2B e P2C.

Então, as amostras foram concentradas por ultracentrifugação, conforme descrito no item 3.6.2.2.

Uma alíquota de cada amostra foi armazenado a 4 °C para titulação, e o restante das amostras foram tratadas com Vertrel-XF[®], conforme descrito no item 3.4.3.

3.8 PESQUISA DE VÍRUS NAS AMOSTRAS DE ÁGUA DE REATOR PELA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO PELA POLIMERASE (PCR)

3.8.1 Extração de DNA viral

A extração do material genético do fago P1 (protótipo viral) e das amostras de água dos reatores foram realizadas sob três protocolos distintos: reagente TRIzol[™] (Invitrogen[™], Carlsbad, California), kit *Power Soil DNA* (MoBio[®]), kit ZR Viral DNA/RNA[™] (ZymoResearch).

3.8.1.1 Extração de DNA viral com reagente TRIzol[™]

Um volume de 300 µL de cada amostra foi misturado com 900 µL de TRIzol[™] e, após incubação por 5 minutos à temperatura ambiente, adicionou-se 240 µL de clorofórmio absoluto. As amostras foram homogeneizadas em vortex por 15 segundos, incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos e, em seguida, centrifugadas a 11.000 $x g$ por 15 minutos a 4 °C em centrífuga refrigerada para microtubos (Hettich Eba12R). O sobrenadante foi desprezado, recuperando-se a parte que contém o DNA viral da fase fenólica e da interfase, adicionando 300 µL de etanol absoluto, homogeneizadas em vortex, incubadas à temperatura ambiente por 03 minutos e, então, centrifugadas a 5.000 $x g$ por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento obtido foi ressuscitado em 500 µL de solução de citrato de sódio 0,1 M e incubado por 30 minutos a 25 °C. As amostras foram novamente centrifugadas a 5.000 $x g$ por 5 minutos a 4 °C. E o sedimento lavado com solução de citrato por mais duas vezes.

O DNA foi precipitado em 1,5 mL de etanol 75%, incubado à temperatura ambiente por 20 minutos e centrifugadas a 4.500 $x g$ por 5 minutos a 4°C. O DNA foi ressuscitado em 50 µL de hidróxido de sódio 8mM e mantido a -80°C até o momento de uso.

3.8.1.2 Extração de DNA viral utilizando kit *Power Soil DNA* (MoBio®)

Um volume de 200 μL de cada amostra foi acondicionado no *Power Bead Tubes*, e o procedimento para extração foi de acordo com o proposto pelo manual do fabricante.

O DNA extraído foi armazenado a $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

3.8.1.3 Extração de DNA viral utilizando kit ZR Viral DNA/RNA™ (ZymoResearch)

Uma alíquota de 100 μL de cada amostra foi misturado com 200 μL de Viral DNA/RNA Buffer e, então, seguiu-se as orientações do fabricante. O DNA extraído foi mantido a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ até o momento de uso.

3.8.2 Quantificação espectrofotométrica do DNA extraído

O DNA extraído, conforme descrito no item 3.8.1, foi quantificado utilizando espectrofotômetro NanoDrop 2000c (ThermoScientific®).

Uma alíquota de 1 μL de cada DNA extraído foi depositada sobre o leitor do espectrofotômetro, a concentração de ácido nucléico foi determinada no comprimento de onda de 260 ηm , sendo expressa em $\eta\text{g}/\mu\text{L}$, e a concentração de proteína residual no comprimento de 280 ηm .

A pureza da amostra foi definida pela razão obtida entre os valores do comprimento de onda de 260 $\eta\text{m}/280\text{ } \eta\text{m}$, sendo uma amostra pura com a razão ideal em torno de 1,8. Já, a razão entre 260 $\eta\text{m}/230\text{ } \eta\text{m}$ indica a possível contaminação por sais ou solventes, sendo considerada uma amostra livre de contaminantes, as quais possuem a razão entre 2,0 e 2,2 (OXFORD GENE TECHNOLOGY, 2011; WILLIAM *et al.*, 1997).

3.8.3 Amplificação do DNA viral

A técnica para detecção de *Myophages* por PCR foi realizada conforme FILÉE *et al.*, 2005.

O par de oligonucleotídeos utilizado foi MZIA-1bis (5'-GATATTTGGIGTTCAGCCATGA-3') e MZIA-6 (5'-CGCGGTTGATTCCAGCATGATTC-3') (Invitrogen™ Life Technologies Brazil), o qual tem como alvo a região do gene estrutural gp23 que codifica a *major capsidprotein* de fagos T4-like, arquétipo da

família *Myoviridae*, e que gera um fragmento de aproximadamente 550 pb.

Como controle positivo foi utilizado o protótipo viral P1 (item 3.6.1), e como controle negativo água ultrapura MilliQ® (Millipore™, Massachusetts, USA).

3.8.3.1 Reação de Amplificação – PCR

Foi realizada a amplificação testando diferentes tipos de enzimas em função dos métodos de extração de DNA aplicados. A eficiência da amplificação foi testada através de um gradiente de temperatura de anelamento, na qual foram testadas as seguintes temperaturas de anelamento: 49 °C, 50 °C e 51 °C, as enzimas Platinum®Taq DNA polimerase (Invitrogen™) e *Tth* (Biotools®). Em relação ao método de extração de DNA, realizou-se o comparativo entre os métodos TRIzol™, kit *Power Soil DNA*, kit *ZR Viral DNA/RNA™*, conforme descrito no item 3.8.

Uma mistura de reagentes, denominada Master Mix 01, foi preparada contendo as seguintes concentrações: 20 pmoles de cada oligonucleotídeos (MZIA-1bis e MZIA-6), dNTP a 0,2 mM (Invitrogen™), 0,5 U de enzima Platinum®Taq DNA polimerase, tampão de reação (200 mM Tris-HCl [pH 8,4], 500 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂) e água ultrapura, com volume final de 25 µL.

A Master Mix 02 foi preparada contendo os mesmos reagentes e nas mesmas concentrações que o Master Mix 01, alterando-se, apenas, os seguintes reagentes: 1 U de enzima *Tth* (Biotools®), tampão de reação (7 mM Tris-HCl [pH 8,4], 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 20 mM (NH₄)₂SO₄), permanecendo o volume final mencionado anteriormente.

À mistura de reagentes foi adicionada uma alíquota de 10 µL de DNA retirado do protótipo viral, extraído pelos diferentes protocolos, e foram acrescidos a cada máster-mix.

A reação de amplificação foi realizada em termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf®) nas seguintes condições: desnaturação das fitas de DNA a 95 °C/90 seg, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C/45 seg, anelamento a 49 °C, 50 °C e 51 °C/1 min., extensão a 72 °C/ 45seg e extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Gibco, Carlsbad, Califórnia, USA) a 1,5% em tampão Tris acetato 1x (TAE; 40 mM Tris-acetato, ácido acético 20 mM, EDTA 0,5 M pH 8,0), contendo 4 µL de brometo de etídeo (5 mg.mL⁻¹; Invitrogen™). A corrida eletroforética foi realizada em cuba de

eletroforese horizontal, contendo tampão TAE 1x, sob tensão de 100 volts. O DNA *ladder* 100 pares de base (Invitrogen™) foi utilizado como referência em todas as corridas. Após o período de uma hora e trinta minutos de corrida, a presença dos fragmentos fora evidenciada no gel documentado em fotografias digitais, por meio da exposição à luz UV, na qual utilizou-se o equipamento de captura de imagens Vilber Lourmat (Fotodocumentador Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, França).

3.8.3.2 Detecção dos fagos nas amostras de água dos reatores por PCR

As amostras de DNA oriundas dos reatores foram obtidas utilizando-se 03 (três) protocolos distintos: reagente TRIzol™ (descrito no item 3.8.1.1), kit *Power Soil DNA* (item 3.8.1.2), kit ZR Viral DNA/RNA™ (item 3.8.1.3). Submeteu-se as amostras a PCR para detecção de miofagos.

Alíquotas de 10 µL de cada amostra foram misturadas à Master Mix 01 e Master Mix 02 e amplificadas conforme descrito nos itens 3.8.3.1, contudo a temperatura de anelamento foi 50 °C/1min (FILÉE *et al.*, 2005).

Como controle positivo da reação foram utilizados 10 µL de DNA, extraído do protótipo viral P1, e, como controle negativo, 10 µL de água ultrapura (MilliQ®).

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% e a presença dos fragmentos amplificados foi evidenciada após exposição a luz UV, conforme descrito no item 3.8.3.1.

As amostras que não apresentaram produtos após amplificação foram reamplificadas. Um volume de 10 µL do produto da primeira reação foi acrescentado aos dois Master Mix (01 e 02) e submetido a nova amplificação, tendo a temperatura de 50 °C/1min para anelamento dos *primers* (item 3.8.3.1).

3.8.3.3 Determinação da presença de inibidores inespecíficos da reação de PCR nas amostras de água de reator

Para verificação da presença de possíveis inibidores inespecíficos da PCR nas amostras de DNA oriundas dos reatores, uma alíquota de 10 µL de DNA extraído do protótipo viral P1 foi misturada a uma alíquota de 10 µL de cada amostra e acrescentadas à Master Mix 01 e à Master Mix 02. A amplificação foi realizada conforme descrito no item 3.8.3.1,

contudo o volume final da reação foi de 50 μL e a temperatura de anelamento foi 50 $^{\circ}\text{C}/1\text{min}$ (FILÉE *et al.*, 2005).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para analisar a porcentagem de recuperação viral, foi realizado o teste estatístico do qui-quadrado. A significância estatística é verificada quando o valor (*p-value*) é menor que 0,05 (5%) (DE GROOT, 1986).

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS REATORES DE CULTURA DE MICRORGANISMOS

Os reatores vêm sendo operados, desde 2007, em regime de batelada alimentada. Estudos já realizados pelo grupo de pesquisa do LTBR-UFSC, demonstram que os reatores se encontram em regime estacionário e estão em equilíbrio (Camacho, 2015; SILVA *et al.*, 2014). Na tabela 7, observa-se que os reatores possuem um desempenho bastante similar em relação ao consumo dos substratos orgânicos, sendo que o nitrato e o propionato foram completamente consumidos. Nesse caso, verificou-se um residual de acetato com variação de 50 a 100 mg C-CH₃COO⁻.L⁻¹, logo, demonstra-se que o consumo de acetato foi parcial. Para Camacho (2015), o melhor doador de elétrons para as BRS é o propionato, pois mantém o metabolismo ativo do consórcio microbiano, já que o consumo de acetato só ocorre quando não há mais propionato disponível.

Tabela 7 - Produção de sulfeto em função do consumo dos substratos, após 48 horas

	Calimentação [mg.L ⁻¹]		Cf [mg.L ⁻¹]		% Remoção	
	Reator	Reator	Reator	Reator	Reator	Reator
	1	2	1	2	1	2
C-CH ₃ COO ⁻	130	130	100	99	30	31
C- CH ₃ CH ₂ COO ⁻	30	30	15	13	15	17
N-NO ₃	26,66	26,66	0	0	26,66	26,66
S-SH ⁻	0	0	109	111	100	100

Fonte: Elaboração da autora, 2017.

Camacho (2015) também demonstrou em seus ensaios que a velocidade de consumo de acetato seria equivalente a de sua produção a partir de propionato, uma vez que este tem como intermediário na sua rota metabólica o acetato, quando ocorre a degradação incompleta.

Para realizar a análise dos sulfetos foi necessário a diluição em 200 vezes, com o intuito de se reduzir a interferência do cloreto e do

sulfato na quantificação dos íons, a partir disso ocorreu a detecção de sulfetos em valores superiores a $100 \text{ mgHS}^- \cdot \text{L}^{-1}$, em ambos os reatores.

Camacho (2015) ao utilizar a equação global para redução biológica do sulfato e oxidação do acetato e do propionato (RITTMANN; MCCARTY, 2001) verificou que a quantidade de sulfeto esperada por mol de carbono foi um pouco maior para o propionato, com produção de $0,46 \text{ mol de H}_2\text{S/ mol C-CH}_3\text{COO}^-$ e de $0,53 \text{ mol H}_2\text{S/ mol C-CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^-$. Considerando que os reatores foram alimentados com uma concentração de $130 \text{ mg C-CH}_3\text{COO}^- \cdot \text{L}^{-1}$ e $30 \text{ mg C-CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- \cdot \text{L}^{-1}$, foi possível estimar que a produção máxima de sulfeto, a partir desses substratos, desprezando-se completamente a desnitrificação e outros possíveis processos anaeróbios, seria de $94 \text{ mg HS}^- \cdot \text{L}^{-1}$, assim, foi observado a produção de sulfeto dentro do esperado.

Já, a concentração de biomassa nos reatores apresentou os seguintes valores médios durante a sua operação, conforme demonstrado na Tabela 8.

Tabela 8 - Caracterização do lodo dos Reatores

	SST ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	SSF ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	SSV ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
Reator 1	17,3	12,2	5,0
Reator 2	16,2	11,6	4,6

Fonte: Elaboração da autora, 2017.

Os resultados obtidos com as determinações analíticas comprovam a presença de bactérias redutoras de nitrato e bactérias redutoras de sulfato na biomassa dos reatores, demonstrando que a alimentação com excesso de carbono e nitrogênio (C:N de 4,6 : 1) foi efetiva para proporcionar o crescimento simultâneo de ambos os grupos microbianos. Silva *et al.* (2014) demonstraram a presença de BRS nos reatores, utilizando a técnica de qPCR.

Camacho (2015) comprovou em seus estudos a presença de bactérias redutoras de nitrato, injetando $4000 \text{ mg N} - \text{NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$ nas colunas, e os ensaios cinéticos demonstraram uma queda imediata na concentração de nitrato ($30 \text{ mg N} - \text{NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$).

4.2 PREPARO DE SUSPENSÃO DE PROTÓTIPO VIRAL

Para a padronização e realização dos ensaios moleculares de detecção de bacteriófagos foram cultivadas linhagens suscetíveis ao

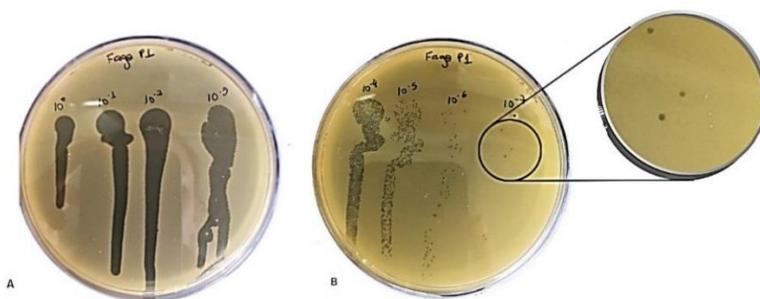
protótipo P1. Esse fago é classificado na família *Myoviridae*, infecta *E. coli* e vem sendo utilizado como modelo para estudo de métodos, por ser um fago virulento que lisa a célula hospedeira (LOBOCKA *et al.*, 2004).

No presente estudo, foi utilizada *E. coli* MG1655 como hospedeira para o fago P1, por ser uma cepa de laboratório com mínima manipulação genética, sendo submetida apenas à luz ultravioleta para inativar os bacteriófagos lambda e à laranja acridina para inibir o plasmídeo F. Nesse sentido, faz-se necessário mencionar que Blattner *et al.* (1998) utilizaram uma mesma cepa de *E. coli* para determinar o genoma completo do bacteriófago P1.

A presença do protótipo viral é revelada através da visualização de placas de lise decorrentes da infecção causada pelo bacteriófago P1 na *E. coli*. A contagem de placas de lise é a metodologia tradicional para detecção de bacteriófagos, apresentando a desvantagem que fagos com cauda podem apresentar placas de lise muito pequenas, grandes ou uma placa de difusão no meio de cultura, contudo é através dessa técnica que é possível obter informações sobre a infectividade dos bacteriófagos e das células hospedeiras (ROSETO, 2009).

A titulação da suspensão viral foi realizada antes (Figura 13) e após (Figura 14) o processo de concentração viral.

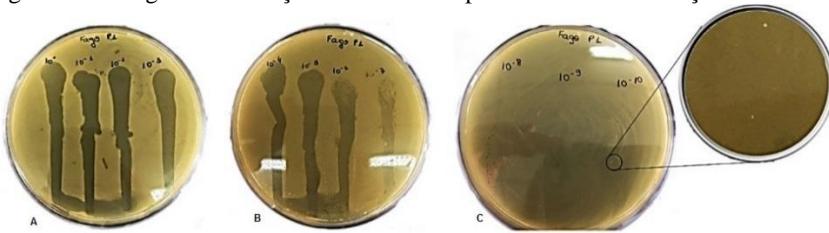
Figura 13 - Imagens da titulação viral, antes do processo de concentração viral



Legenda: (A) demonstra as placas de lises ocasionadas pelo fago P1 nas bactérias *E. coli* nos títulos 10^0 a 10^{-3} ; (B) demonstra as placas de lises ocasionadas pelo fago P1 nas bactérias *E. coli* nos títulos 10^{-4} a 10^{-7} sendo que no título 10^{-7} é possível realizar a contagem do número de placas, conforme placas na lupa.

Fonte: Registro feito pela autora, 2017.

Figura 14 - Imagens da titulação viral antes do processo de concentração viral



Legenda: (A) demonstra as placas de lises ocasionadas pelo fago P1 nas bactérias *E.coli* nos títulos 10^0 a 10^{-3} ; (B) demonstra as placas de lises ocasionadas pelo fago P1 nas bactérias *E.coli* nos títulos 10^{-4} a 10^{-7} ; (C) demonstra as placas de lises ocasionadas pelo fago P1 nas bactérias *E.coli* nos títulos 10^{-7} a 10^{-10} , sendo que no título 10^{-10} é possível realizar a contagem do número de placas, conforme placas de lise ilustradas na lupa.

Fonte: Registro feito pela autora, 2017.

Considerando o número de placas de lise observadas e com base nas equações 01 e 02, foi determinada a presença de 5×10^7 UFP de P1 em $10 \mu\text{L}$ de suspensão, antes do processo de concentração viral. Após o processo de concentração viral, foi determinada uma concentração de 4×10^{10} UFP/ $10 \mu\text{L}$.

4.3 MÉTODO DE PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Vários métodos de concentração viral de amostras ambientais foram propostos nos últimos anos, contudo nenhum estabelecido como padrão. Vale ressaltar que a maior parte dos métodos foram desenvolvidos para a concentração de *Enterovirus*, com o intuito de realizar monitoramento viral devido ao problema de saúde pública decorrente de poliomielite (MARQUES, 1987; ABBASZADEGAN et al., 1993; BOSCH et al., 2008; CHO et al., 2000). No desenvolvimento da virologia ambiental, esses métodos foram empregados para a concentração de outros vírus entéricos, como os rotavírus, norovírus, vírus da Hepatite A, entre outros (WYN-JONES; SELLWOOD, 2001, BOSCH et al., 2008, GARRAFA, 2009).

A literatura sugere o uso do método Viradel (*virus-adsorption-elution*), sendo considerada a melhor alternativa para a concentração de vírus presentes em amostras ambientais que se baseiam na adsorção das partículas virais a filtros de microporosidade, carregados eletricamente, e posterior eluição com pequenos volumes (BOSCH et al., 2008; HILL et al., 2009).

Para a concentração das amostras desta pesquisa, foi realizada uma adaptação do método proposto por Mehnert e Stewien (1993), o qual é baseado no método Viradel e consiste na filtração através de membrana carregada eletropositivamente ZP 60S e sobreposta com pré-filtro AP-20 para clarificação. Tal método vem sendo utilizado, desde 1988, pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Vírus Entéricos Humanos e Animais (ICB/USP) para pesquisa de rotavírus, adenovírus e vírus em amostras de solo, esgoto, água superficiais (MEHNERT et al., 1997; QUEIROZ et al., 2001; GARRAFA, 2001; PAULI, 2003; SANTOS et al., 2004; PIRANHA et al., 2006; SASSAROLI, 2002).

A escolha da técnica para esta pesquisa foi definida pelo tipo de amostra, pela infraestrutura do laboratório e disponibilidade financeira, assim optou-se pelo uso da centrifugação para clarificação das amostras, seguida do processo de eluição e então a ultracentrifugação.

O processo de centrifugação a $6.000 \times g$ por 15 minutos é indicado para a clarificação das amostras que tem por objetivo a eliminação de resíduos indesejáveis (bactérias, fungos, DNA bacteriano, etc).

Já, o método de concentração viral por adsorção/eluição a sais, baseia-se na propriedade dos vírus de adsorverem eletrostaticamente a estas substâncias, como o óxido de ferro, fosfato, hidróxido de alumínio, extrato de carne ou carvão ativado (FON; LIPP, 2005, WYN-JONES; SELLWOOD, 2001, SEELEY; PRIMROSE, 1982).

O extrato de carne foi utilizado como eluente, uma vez que Shields e Farrah (1986) demonstraram em seus estudos que os bacteriófagos são sensíveis a pH extremos, assim as técnicas empregando o uso de membranas carregados negativamente são inviáveis. Logo, sugere-se o uso de membranas carregadas positivamente, e para aumentar a eficiência na eluição tem sido utilizado solução proteica a base de extrato de carne.

O extrato de carne é constituído por grandes moléculas orgânicas, as quais rompem as ligações hidrofóbicas entre os bacteriófagos e superfícies aderida, o que o torna um melhor eluente em relação aos demais: citrato de potássio ou pirofosfato de sódio (GERBA, 1984; WILLIAMSON; WOMMACK; RADOSEVICH, 2003).

Devido à alta eficiência do extrato de carne, optou-se pelo seu uso para eluição das partículas virais que poderiam estar aderidas aos sedimentos do reator. Não foram utilizados filtros, devido ao pequeno volume a ser processado.

A ultracentrifugação consiste na utilização de força gravitacional superior a $100.000 \times g$ por 1 hora para possibilitar a sedimentação de

partículas virais. Esse método é indicado para análise de pequenos volumes (MEHNERT et al., 1997, WYN-JONES; SELLWOOD, 2001). Ao comparar o volume processado em outros trabalhos na área ambiental com o presente estudo, tem-se que este processou 2.200 mL de amostra, assim, percebe-se que o método escolhido é o mais indicado. Para o estudo que avaliou a qualidade virológica do efluente doméstico tratado e disponibilizado para reuso na cidade de São Paulo, foram utilizados volumes de 15 L de esgoto bruto e 100 L de esgoto tratado (GARRAFA, 2009). A pesquisa que visou analisar a população de vírus das famílias *Phycodnaviridae* e *Myoviridae* nos rios Cuieiras, Negro e Solimões, baseou-se num volume de 200 L de água para cada amostra (GIMENES, 2010).

Para Seeley e Primrose (1982) o método de ultracentrifugação apresenta as vantagens de rapidez e não seletivo, contudo apresenta as desvantagens do processamento de pequenos volumes de amostra. Mesmo assim, optou-se pelo uso dessa técnica por ser eficiente, simples e rápido.

Após a concentração viral, as amostras foram divididas em duas alíquotas, sendo uma alíquota tratada com o reagente Vertrel-XF[®] e a outra não.

O Vertrel-XF[®] é composto por *hydrofluorocarbon (2,3-dihydrodeca-fluoropentane)* com *trans-1,2-dichloroethylene*. Tal solvente foi criado a partir da proibição do uso da substância Freon TF, devido a emissão de gases que afetavam a camada de ozônio, auxiliando o fenômeno de aquecimento global. Dessa forma, o Vertrel-XF[®] é aceito pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA) sob o programa da Política de Novas Alternativas Significativas (SNAP) como substitutos de substâncias que destroem o ozônio (DUPONT, 2007).

O uso do Vertrel-XF[®] é adequado para remoção de lipídeos, limpeza de partículas do solo e remoção de partículas (DUPONT, 2007). Assim, esse reagente vem sendo amplamente utilizado para limpeza de amostras ambientais, uma vez que a presença de resíduos pode afetar as análises moleculares subsequentes, bem como a extração de DNA (GARRAFA, 2009; GIMENES, 2010).

4.3.1 Avaliação da Recuperação de Viral em amostras de água do reator

Para avaliar a recuperação viral, inoculou-se uma suspensão do protótipo viral P1 com o título de 5×10^5 UFP/1mL nas amostras de água do reator e, então, realizou-se a concentração viral. Nesse processo foi

verificado a eficiência do reagente Vertrel-XF[®]. Os resultados desses ensaios são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Índice de recuperação do método de concentração viral aplicado à amostras de água do reator, determinado por titulação

Tratamento das amostras com Vertrel-XF [®]	Ensaio	Lisado semeado UFP/mL	Recuperado UFP/mL		Total recuperado UFP/mL (P1+P2)	% Recuperação	% Recuperação Total
			P1	P2			
ANTES	A		2,6 x 10 ⁴	7 x 10 ⁴	9,6 x 10 ⁴	19,20%	
	B	5 x 10 ⁵	1,7 x 10 ⁴	3 x 10 ⁴	4,7 x 10 ⁴	9,40%	17,5% ¹
	C		3 x 10 ⁴	9 x 10 ⁴	1,2 x 10 ⁵	24%	
^(a) p-valor			<0,195				
DEPOIS	A		2 x 10 ⁴	1,2 x 10 ⁵	1,4 x 10 ⁵	28%	
	B	5 x 10 ⁵	4 x 10 ⁴	7 x 10 ⁴	1,1 x 10 ⁵	22%	27,7% ²
	C		4,5 x 10 ⁴	1,2 x 10 ⁵	1,6 x 10 ⁵	33%	
^(b) p-valor			<0,03				
^(c) p-valor					<0,001		

Legenda: ⁽¹⁾Média do percentual de recuperação dos ensaios antes do tratamento com Vertrel-XF[®]. ⁽²⁾Média do percentual de recuperação dos ensaios após o tratamento com Vertrel-XF[®](P1). Amostra processada a partir do sobrenante. ^(P2) Amostra processada a partir do sedimento. ^(a)Significância entre os índices de recuperado de P1 e P2, antes do tratamento com Vertrel-XF[®]. ^(b)Significância entre os índices de recuperado de P1 e P2, depois do tratamento com Vertrel-XF[®]. ^(c)Significância entre a recuperação total antes e depois do tratamento com Vertrel-XF[®].

Fonte: Elaboração da autora, 2017.

Ao submeter os resultados obtidos ao teste do qui-quadrado, observou-se que o valor “p” (*p-value*), obtido da análise entre P1 e P2 antes do tratamento das amostras com Vertrel-XF[®] foi de 0,195, indicando que não há diferenças estatisticamente significantes da recuperação em amostras processadas a partir do sobrenadante (P1) e do sedimento (P2).

Já, na análise entre P1 e P2 após o tratamento com Vertrel-XF[®] e do percentual total de recuperação do lisado, apresentou-se valores

próximos a zero, indicando a existência de diferenças estatisticamente significantes entre as amostras.

A recuperação viral média obtida pelo método de concentração foi de 17,5%, para as amostras antes do tratamento com Vertrel-XF[®] e de 27,7% após o uso do reagente, demonstrando que o Vertrel-XF[®] foi eficiente para a remoção de lipídeos e proteínas das amostras e, conseqüentemente, causou uma maior recuperação das partículas virais que estão aderidas ao material particulado.

No final dos anos 70, pesquisadores desenvolveram um método que utiliza filtro de celulose e terra de diatomáceas carregado positivamente para concentração de poliovírus, sendo sua eficiência de recuperação comparável ao do método da filtração com filtros de carga negativa, contudo, a adsorção das partículas virais à superfície do filtro ocorre em um intervalo amplo de pH, sem a necessidade de aplicação de sais (SOBSEY e JONES, 1979; ESTES et al., 1979; RAO; METCALF; MELNICK, 1986).

Vários pesquisadores utilizaram o novo método e comprovaram a sua eficiência, tendo uma recuperação de 50% de enterovírus de águas cloradas e de esgoto (CHANG; FARRAH; BITTON, 1981; SOBSEY; GLASS, 1980; SOBSEY; JONES, 1979) e de 22% a 50% na recuperação de poliovírus de água potável (SOBSEY; JONES, 1979).

Ao se observar as taxas de recuperação viral, percebe-se que é bastante inferior aos índices obtidos em estudos anteriores realizados no Brasil, sendo de 81% em água de esgoto (MEHNERT et al., 1997), a partir de água de esgoto bruto, e 90,7%, a partir de água de córrego (QUEIROZ et al., 2001). Os dois estudos utilizaram a mesma metodologia, baseada no método Viradel (*virus-adsorption-elution*), no qual realizou-se primeiramente uma filtração através de membrana eletropositiva e eluição com extrato de carne 3%.

Williamson; Wommack; Radosevich (2003) avaliaram os métodos de recuperação viral adequados para posterior análise de detecção de bacteriófagos (plaqueamento, microscopia de fluorescência e microscopia eletrônica de transmissão). No presente estudo foram testados 04 (quatro) tampões de eluição (extrato de carne, tampão de glicina, pirofosfato de sódio e citrato de potássio).

O extrato de carne apresentou uma eficiência de 26% na recuperação de bacteriófagos, contudo ao analisar a recuperação viral de bacteriófagos T4 em solo utilizando-se extrato de carne como eluente, o índice de recuperação foi de 16% (WILLIAMSON; WOMMACK; RADOSEVICH, 2003). Isso demonstrou que o índice de recuperação de

bacteriófagos da família *Myoviridae*, alvo do presente estudo, superou o esperado na literatura.

A recuperação viral de 27,7% demonstra que o método aplicado é melhor para a eluição dos bacteriófagos presente nas amostras. Dessa forma, tem-se a indicação que o método proposto como um todo pode ser aplicado na extração de bacteriófagos presente em amostras oriundas de água do reator.

4.4 PESQUISA DE VÍRUS NAS AMOSTRAS DE ÁGUA DE REATOR

4.4.1 Extração de DNA

Foram testados três protocolos distintos para a extração de DNA do protótipo viral (P1) e para todas as amostras oriundas dos reatores (reagente TRIzol, kit *Power Soil DNA*, kit ZR Viral DNA/RNA).

O uso do kit *Power Soil DNA* é recomendado para extração de DNA de amostras de solo, fezes e ambientais, uma vez que elimina substâncias húmicas e outros inibidores de PCR, segundo orientações do fabricante (MO BIO, 2016).

O kit ZR Viral DNA/RNA™ é indicado pelo fabricante para purificação e extração de DNA de forma rápida em uma vasta gama de amostras, plasma, soro, sobrenadantes de cultura, células animais e tecido (ZYMO RESEARCH, 2017).

A técnica de extração de DNA na qual utiliza-se o reagente TRIzol™ é usada em amostras de tecidos ou células de animais, plantas, bactérias, vírus e leveduras. Essa técnica de isolamento de DNA é bastante utilizada e difundida, contudo a presença de TRIzol na amostra extraída pode causar a inibição da reação de PCR (SCHRADER et al., 2012).

A concentração de ácido nucléico foi determinada no comprimento de onda de 260 nm, e a concentração de proteína residual no comprimento de 280 nm. A razão obtida entre 260/280 determina a pureza da amostra. Em uma amostra pura a razão ideal é em torno de 1,8, sendo que valores mais baixos indicam contaminação por proteína. Já, a razão entre 260/230 indica possível contaminação por sais ou solventes, sendo considerado amostra livre de contaminantes as que possuem a razão entre 2,0 e 2,2 (OXFORD GENE TECHNOLOGY, 2011; WILLIAM, et al., 1997).

Observando os dados para cada Kit, apresentados na Tabela 10, percebe-se que nenhum dos métodos utilizados foi eficiente para a remoção de sais ou solventes das amostras, contudo o Kit *Power Soil* DNA foi o que apresentou melhor pureza (260/280) do DNA extraído, exceto para a amostra do sedimento oriunda do Reator 1, a qual teve sua melhor razão (3,61) quando utilizado o reagente TRIzol.

Tabela 10 - Resultados da quantificação do DNA extraído com TRIzol, Kit *Power Soil* DNA e Kit ZR Viral DNA/RNA

Amostra	TRIzol			Kit <i>Power Soil</i> DNA			Kit ZR Viral DNA/RNA		
	Concentração de DNA (µg/µL)	±DP	Absorbância (nm) 260/280	Concentração de DNA (µg/µL)	±DP	Absorbância (nm) 260/280	Concentração de DNA (µg/µL)	±DP	Absorbância (nm) 260/280
P1	5,30	1,61	1,42	97,30	1,98	1,82	1.354,70	0,99	1,39
R1 Sobrenadante	12,00	1,02	1,63	4,50	1,60	1,73	65,90	1,68	1,63
R1 Sedimento	11,35	1,23	1,82	5,50	1,58	3,61	23,90	1,55	1,40
R2 Sobrenadante	9,22	1,57	1,69	1,60	1,23	1,90	15,60	1,35	1,59
R2 Sedimento	6,40	1,60	1,34	1,40	1,55	1,75	7,50	1,48	1,38

Fonte: Elaboração da autora, 2017.

O controle positivo (P1) para todas as reações de amplificação do DNA viral, através de PCR, deverá ter o seu DNA extraído com o kit *Power Soil DNA*, pois com esse método de extração a amostra obteve um DNA mais puro e com uma concentração de 97,30 (ng/μL). Segundo a literatura, para as amplificações de bacteriófagos obterem sucesso deve haver uma concentração em torno de 100 ng/μL de DNA (FULLER *et al.*, 1998; ZHONG *et al.*, 2002; BOKER *et al.*, 2006; GIMENES, 2010).

Quanto às amostras oriundas dos reatores, não foi possível determinar qual o melhor método de extração de DNA, uma vez que se obteve uma baixa concentração de DNA extraído e contaminação por sais ou solventes, após a constatação de contaminação por sais ou solventes, foi realizada a limpeza das amostras utilizando solução de citrato de sódio 0,1 M a 10% de etanol (Anexo E).

Então, optou-se que seriam utilizados os kits *Power Soil DNA* e ZR Viral DNA/RNA para extração de DNA viral das amostras de água dos reatores, uma vez que devido às características ambientais das amostras, os kits são as melhores opções para purificação e extração do DNA.

Neste estudo, ao analisar a população de *Phycodnaviridae* e *Myoviridae* nos rios Cuieiras, Negro e Solimões, foi utilizado o kit *Power Soil DNA* para extração de DNA, obtendo-se resultados satisfatórios na técnica de PCR (GIMENES, 2010).

4.4.2 Amplificação do DNA viral

A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) a qual consiste na amplificação da molécula de DNA, apesar de bastante difundida na virologia ambiental desde a década de 90 (ABBASZADEGAN *et al.*, 1993; GAJARDO *et al.*, 1995; FONG e LIPP, 2005), vem sendo utilizada para a detecção de bacteriófagos em amostras marinhas. Filée *et al.* (2005), detectaram bacteriófagos do tipo T4 de vários ambientes marinhos (baías da Colúmbia Britânica, o leste do Golfo do México e o Oceano Ártico), amplificando a região do gene g23 o qual codifica a principal proteína do cápsido em todos os fagos do tipo T4. No Brasil, Gimenes (2010) analisou a população de *Phycodnaviridae* e *Myoviridae* nos rios Cuieiras, Negro e Solimões, localizados na Bacia Amazônica, utilizando métodos moleculares (PCR, DDGE – *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*, clonagem, sequenciamento e microscopia eletrônica de transmissão – MET). Os

Myoviridae foram detectados em todos os rios, tanto com o método PCR como a MET.

Tendo em vista as dificuldades de cultivos de muitos vírus e seus respectivos hospedeiros, bem como o estabelecimento de métodos de detecção por PCR nos últimos anos, as pesquisas na área de ecologia viral focaram na aplicação de análises metagenômicas, as quais estão trazendo algumas respostas quanto à composição do viroplâncton, especialmente, no ambiente aquático marinho.

A metagenômica vem sendo utilizada para realizar a análise do conjunto dos genomas microbianos de uma amostra ambiental, tanto do ponto de vista das sequências, quanto das funções. Assim, na virologia, tem-se por objetivo avaliar o genoma de todos os vírus existentes em amostras ambientais (água de lagos, água de reuso) ou biológicas (aspirados do trato respiratório, fezes humanas), tornando-se uma ferramenta muito importante atualmente na descoberta de novos vírus em amostras ambientais e biológicas (CASTRIGNAMO; NAGASSE-SUGAHARA, 2014; LYSHOLM, *et al.*, 2012, PHAN, *et al.*, 2011; DJIKENG, *et al.*, 2009; ROSARIO, *et al.*, 2009).

Angly *et al.* (2006) analisaram diferentes amostras, coletadas de diferentes regiões do oceano (Oceano Ártico, da costa da Colúmbia Britânica, do Golfo do México e do Mar dos Sargazos), utilizando o método de metagenômica e concluíram que a maioria das sequencias virais encontradas não era semelhante as das bases de dados.

Praticamente, não existe qualquer informação sobre o número de partículas de linhagens específicas de fagos em água do mar e no que diz respeito aos sedimentos marinhos. Essas informações podem ser obtidas apenas por plaqueamento direto da amostra ou pelo método de número mais provável. Vários autores têm tentado, sem sucesso, o isolamento de fagos por métodos diretos, e outros embora por vezes tiveram êxito, não publicaram suas conclusões (ROSETO, 2009; ACKERMANN; BERTHIAUME; TREMBLAY, 1998).

A técnica de PCR tem como vantagem possibilitar a amplificação e a detecção de pequenas quantidades virais, indetectáveis pelos métodos tradicionais, uma vez que uma cópia do genoma viral é suficiente (BUESA *et al.*, 1996). Segundo Bosch *et al.* (2008), essa técnica é considerada a melhor para detecção viral.

A elevada sensibilidade justifica a importância do desenvolvimento de um protocolo para detecção de bacteriófagos através da PCR, uma vez que o cultivo de bactérias redutoras de sulfato apresenta limitações, pois não suportam oxigênio, o que dificulta a detecção pelos métodos convencionais (SILVA, 2010).

4.4.2.1 Determinação de parâmetros para PCR

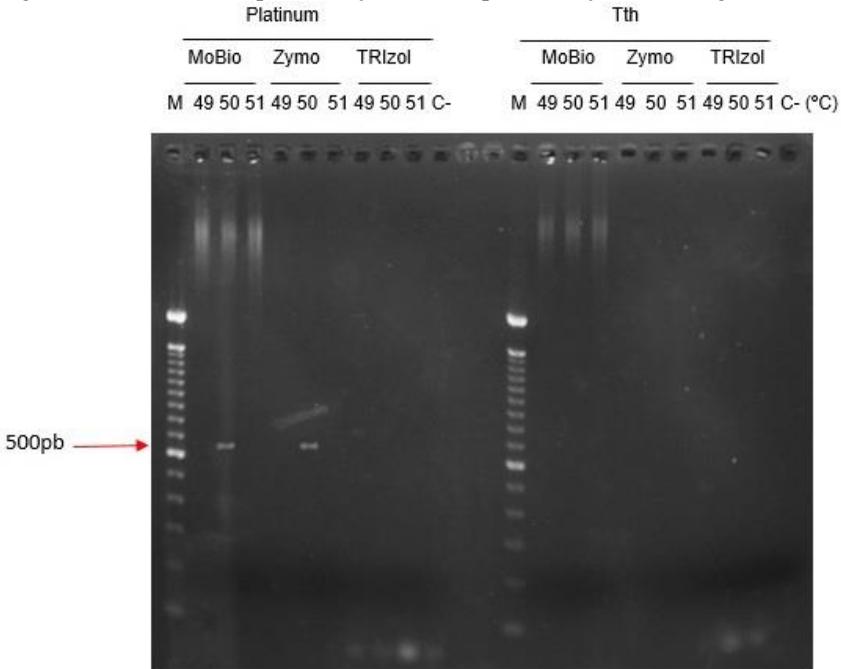
Considerando o tipo das amostras nas quais a reação de PCR seria aplicada, diferentes enzimas polimerases e temperaturas de anelamento foram analisadas através de um gradiente para se determinar as condições ideais de amplificação do DNA viral do protótipo (P1), levando em consideração parâmetros estabelecidos por Fillé et al. (2005). A temperatura ideal de anelamento foi de 50 °C, assim foram testadas temperaturas de anelamento acima e abaixo desta. A enzima indicada é a Platinum®Taq DNA polimerase, por se tratar de amostra de ambiente natural. Foi utilizada também a enzima *Tth* e foram realizados testes para determinar o melhor método de extração de DNA, conforme demonstrado no item 3.8.1.

A enzima *Tth*, obtida de *Thermus thermophilus*, é resistente à incubações prolongadas em altas temperaturas (superiores a 95 °C) e também possui uma atividade de exonuclease 5' → 3'. A *Tth* DNA polymerase é recomendada para uso em PCR, RT-PCR, transcrição reversa e reações de extensão de iniciador à temperaturas elevadas (ROCHE, 2013). Além disso, é uma polimerase que exibe atividade mesmo quando as amostras são de composição complexa como água de esgoto (GARRAFA, 2009).

Já, a enzima Platinum®Taq DNA polimerase é constituída por anticorpos, os quais são específicos para cada DNA polimerase. Esses inibem a atividade da polimerase à temperatura ambiente, assim a enzima é ativada a 94 °C durante o início da PCR, porque a temperatura ocasiona a dissociação dos anticorpos e ativa a atividade da enzima (INVITROGEN, 2015).

Na Figura 15, é possível observar a presença de um fragmento de aproximadamente 550 pb, o qual corresponde à amplificação da região do gene da glicoproteína de superfície *gp23* de miofagos, demonstrando que o protótipo viral foi amplificado quando utilizado kits *Power Soil* DNA e *ZR Viral DNA/RNA™* para extração de DNA. Confirmou-se, também, que a melhor temperatura de anelamento para amplificação do DNA é 50 °C, utilizando-se a enzima Platinum®Taq DNA polimerase, conforme demonstrado por Filé et al. (2005).

Figura 15 - Resultado da padronização da PCR para detecção de miofagos



Legenda: DNA extraído do protótipo viral (P1) com *Power Soil DNA* (MoBio), *ZR Viral DNA/RNA™* (Zymo) e *TRIZol* e amplificados com as enzimas *Platinum®Taq* DNA polimerase e *Tth*, nas temperaturas de anelamento de 49, 50 e 51 °C. Controles negativo (C-) da reação. Marcador de peso molecular: DNA ladder de 100pb (M). Gel agarose a 1,5% corado com solução de brometo de etídio.

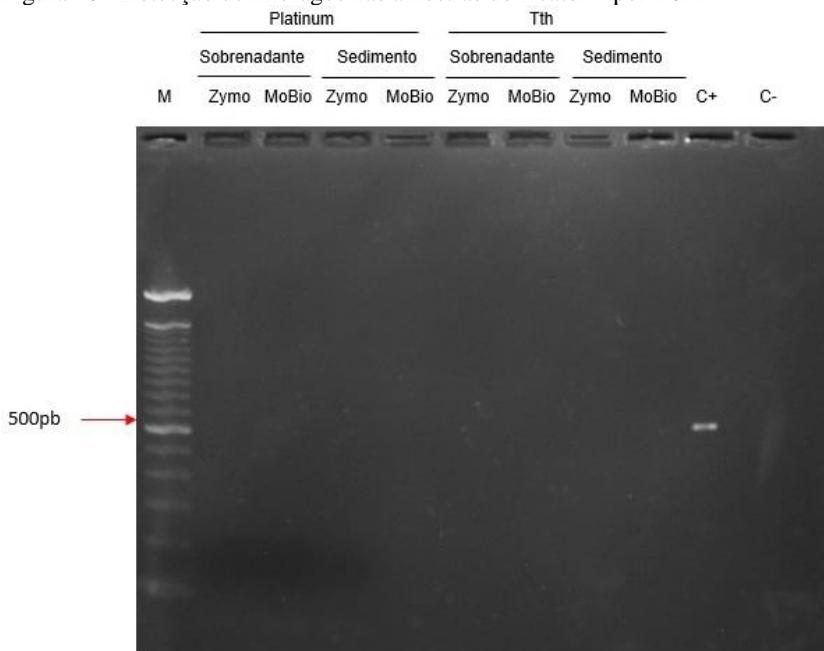
Fonte: Registro feito pela autora, 2017.

4.4.2.2 Detecção viral na água dos reatores

O DNA viral das amostras de água de poço de petróleo do reator 1 e reator 2, tanto do sedimento como do sobrenadante, foi extraído utilizando-se todos os métodos descritos no item 3.8.1. A partir disso, procurou-se determinar qual o melhor método de extração do DNA das amostras. A amplificação foi realizada, utilizando-se dois tipos de enzima: a *Platinum®Taq* DNA polimerase e a *Tth*, pois havia, também, o intuito de determinar qual a melhor delas a ser aplicada no caso.

Nenhuma das amostras submetidas a PCR apresentou amplificação do material genético. Tentou-se, então, a reamplificação dos produtos de PCR para verificar se o não aparecimento de fragmentos no gel seria resultado da pouca quantidade de amplicons. Entretanto, não houve sucesso (Figuras 16 e 17).

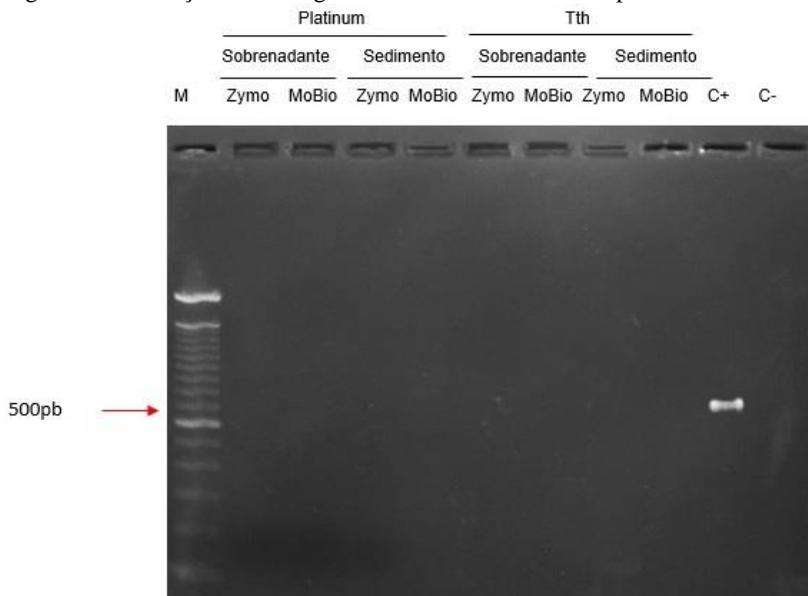
Figura 16 - Detecção de miofagos nas amostras do Reator 1 por PCR



Legenda: DNAs extraídos de sobrenadante e do sedimento com kits comerciais *Power Soil DNA* (MoBio), *ZR Viral DNA/RNA™* (Zymo) e amplificados com as enzimas *Platinum®Taq DNA* polimerase e *DNA Tth* (Biotools®) na temperatura de anelamento de 50 °C. Controles negativo (C-) e positivo (C+) da reação. Marcador de peso molecular: *DNA ladder* de 100pb (M). Gel agarose a 1,5% corado com solução de brometo de etídio.

Fonte: Registro feito pela autora, 2017.

Figura 17 - Detecção de miofagos nas amostras do Reator 2 por PCR



Legenda: DNAs extraídos de sobrenadante e do sedimento com kits comerciais *Power Soil DNA* (MoBio), *ZR Viral DNA/RNA™* (Zymo) e amplificados com as enzimas *Platinum®Taq* DNA polimerase e DNA *Tth* (Biotools®) na temperatura de anelamento de 50 °C. Controles negativo (C-) e positivo (C+) da reação. Marcador de peso molecular: DNA *ladder* de 100pb (M). Gel agarose a 1,5% corado com solução de brometo de etídio.

Fonte: Registro feito pela autora, 2017.

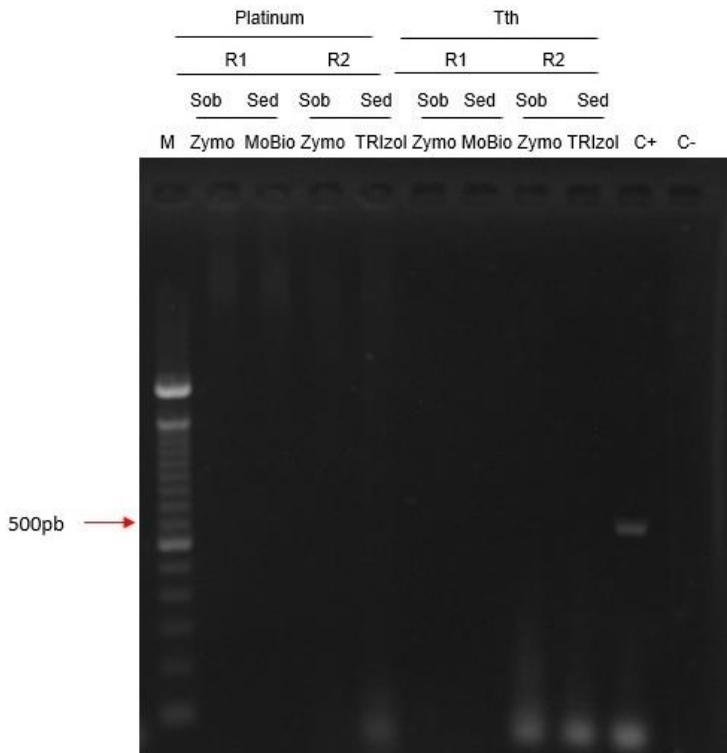
Como não houve sucesso na amplificação das amostras oriundas dos reatores, foi realizado uma PCR para verificação da presença de possíveis inibidores inespecíficos nas amostras (teste de *spike*), contudo, conforme demonstrando pela Figura 18, não ocorreu amplificação do material genético, o que indica a presença de inibidores.

Os inibidores de PCR geralmente exercem seus efeitos através da interação direta com DNA ou através da DNA polimerases. A ligação direta ao DNA pode ocorrer tanto em fita simples ou nas duplas fitas, podendo comprometer a amplificação (BESSETTI, 2007; SCHRADER et al., 2012).

Os inibidores podem também interagir diretamente com o DNA polimerase, e por serem cofatores causam inibição da reação. Quanto à interação com o magnésio, o qual é um cofator crítico, os inibidores

podem causar redução da disponibilidade do Mg^{2+} ou interferirem diretamente na ligação do Mg^{2+} à polimerase (BESSETTI, 2007).

Figura 18 - Resultado do ensaio para avaliação da presença de inibidores nas amostras de água dos reatores pela PCR



Legenda: Sob – sobrenadante; Sed – sedimento; R1 – reator 1; R2 – reator 2. DNAs extraídos de sobrenadante e do sedimento com kits comerciais *Power Soil DNA* (MoBio), *ZR Viral DNA/RNA™* (Zymo) e *TRIzol* e amplificados com as enzimas *Platinum®Taq* DNA polimerase e *DNA Tth* (Biotools®) na temperatura de anelamento de 50 °C. Controles negativo (C-) e positivo (C+) da reação. Marcador de peso molecular: *DNA ladder* de 100pb (M). Gel agarose a 1,5% corado com solução de brometo de etídio.

Fonte: Registro feito pela autora, 2017.

As principais fontes de inibidores são os materiais e reagentes que entram em contato com as amostras durante o processamento ou a purificação do DNA, ou já estão ligadas a própria amostra. Os principais

inibidores incluem excesso de KCl, NaCl e outros sais, detergentes iônicos, etanol, isopropanol, fenol, entre outros (BESSETTI, 2007; SCHRADER *et al.*, 2012).

As amostras que apresentam grande concentração de inibidores são as oriundas dos fluídos biológicos (sangue, urina, sêmen), do material vegetativo (plantas), dos compostos húmicos (solo, sedimentos naturais da água). Nas amostras oriundas da água e do meio ambiente, conforme demonstrado por Abbaszadegan *et al.* (1993); Ijzerman *et al.* (1997), os principais inibidores são resíduos, ácidos fulvicos, ácidos húmicos, material húmico, íons metálicos e polifenóis.

As amostras ambientais podem ser muito diversas e derivadas de diferentes locais, incluindo solo, água ou ar. Essa grande variedade leva a presença de diferentes inibidores de PCR. Vale ressaltar que a biomassa e o solo podem conter ácidos húmicos e fulmínicos, que inibem a PCR mesmo em baixas concentrações (IJZERMAN *et al.*, 1997). Já, em amostras oriundas de esgoto, ocorre a presença de gorduras, proteínas, polifenóis e metais pesados. E, em águas residuais é encontrado polissacarídeos, íons metálicos (ferro e alumínio) e RNAses, sendo inibidores comuns presentes em amostras ambientais (SHIEH *et al.*, 1995; SCHRADER *et al.*, 2012). Isso comprova que as amostras oriundas dos reatores possuem inibidores da própria amostra ou decorrente do processo de extração do DNA, conforme já discutido no item 4.4.1. As amostras de DNA extraídas apresentam grande concentração de sal, o qual é um inibidor de PCR.

Outro ponto é a concentração do $MgCl_2$, a qual é considerada um fator crítico da PCR, pois concentrações altas levam a formação de bandas inespecíficas, e baixas concentrações podem levar a inativação da reação, causando a ausência de produto. Nesse caso, seria interessante realizar um gradiente para determinar a melhor concentração de $MgCl_2$ para a reação em questão (BESSETTI, 2007; SCHRADER *et al.*, 2012). No entanto, a concentração de $MgCl_2$ utilizada no presente estudo foi baseada no ensaio de padronização realizado por Fielé *et al.* (2005) e confirmada por Gimenes (2010).

Vale ressaltar que, por tratar-se de amostra de ambiente natural, há a presença de bactérias tanto nos reatores como nas alíquotas coletadas, e elas apresentam um papel importante na inativação e degradação da partícula viral. O capsídeo viral é composto de proteínas e por isso pode ser uma fonte de nutrientes para as bactérias. Além disso, as bactérias produzem enzimas proteolíticas e nucleases, e o capsídeo viral é extremamente suscetível à ação das referidas enzimas, as quais podem degradar a partícula viral, liberando o DNA ou o RNA

no meio, danificando ou inativando, além de causar uma posterior perda de infectividade viral (SILVA, 2010; RODRIGUEZ; PEPPER; GERBA, 2009; GUARDABASSI et al., 2003).

Há relatos na literatura de que a contaminação bacteriana em técnicas para a detecção de ácidos nucleicos precisa ser reconhecida por ter potencial perigo em diagnóstico virológico, já que as enzimas RNAses e DNAses bacterianas podem acarretar em resultados falso-negativos ou inválidos, devido a degradação do RNA e DNA (SILVA, 2010; CLASSEN; VAN ZYL; PREISER, 2008). O mesmo pode ocorrer em análises ambientais, sendo que os resultados aqui apresentados podem ser falso-negativos, devido a todas as justificativas aqui expostas.

Foi possível a padronização de um protocolo de PCR para detecção de miofagos, utilizando-se o protótipo viral, contudo há necessidade da continuidade de pesquisas relacionadas para a determinação de um protocolo de extração de DNA eficiente para amostras oriundas de água do reator.

O ideal seria realizar os futuros estudos com água de lavagem coletada diretamente de um poço de petróleo, uma vez que o reator vem sendo operado no laboratório a quase dez anos, podendo ter ocorrido alterações microbiológicas significativas, e assim não sendo possível saber se há presença de partículas virais nos reatores.

5 CONCLUSÕES

O método utilizado no processamento das amostras se constituiu das seguintes etapas: clarificação, eluição com extrato de carne, ultracentrifugação e tratamento das amostras com Vertrel-XF[®]. Foi capaz de uma recuperação de 27,7% dos fagos semeados experimentalmente em amostras de água de reator, uma vez que Williamson; Wommack; Radosevich (2003) demonstraram em seus estudos um índice de recuperação de *Myoviridae* de 16%.

Face a complexidade da composição das amostras oriundas de água do reator, não foi possível determinar qual o melhor método de extração de DNA. Contudo, a PCR para detecção de miofagos originado do protótipo viral (P1) foi padronizada, entretanto a possível presença de inibidores inespecíficos interferiu na detecção dos vírus nas amostras de águas de reator.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Isolar Bactérias Redutoras de Sulfato presente em poços de petróleo, operados *offshore*.
- Isolar bacteriófagos que infectem Bactérias Redutoras de Sulfato.
- Realizar a purificação correta para total limpeza do DNA viral, oriunda de amostras de poço de petróleo.
- Realizar a técnica de concentração viral padronizada por este trabalho, utilizando-se uma amostra oriunda diretamente de um poço de petróleo *offshore*.
- Realizar a técnica de PCR utilizando uma amostra oriunda diretamente de um poço de petróleo *offshore*.
- Realizar a análise do conjunto dos genomas microbianos utilizando a técnica de metagenômica em amostras oriundas diretamente de um poço de petróleo, operado em *offshore*.

REFERÊNCIAS

ABBASZADEGAN, M. et al. Detection of enteroviruses in groundwater with the polymerase chain reaction. **Appl Environ Microbiology**, v. 59, n. 13, p. 18-24, may. 1993.

ACKERMANN, H. W.; EISENSTARK, A. The present stage of phage taxonomy. **Intervirology**, v. 3, p. 201-219, may. 1974.

ACKERMANN, H. W. Frequency of morphological phage descriptions. **Arch. Virol**, v. 124, n. 3-4, p. 201-209, 1992.

ACKERMANN, H. W.; BERTHIAUME, L; TREMBLAY, M. **Virus Life in Diagrams**. Washington: CRC Press, 1998.

ACKERMANN, H. W. Frequency of morphological phage descriptions in 1995. **Archives of Virology**, v. 141, p. 209-218, 1996.

ACKERMANN, H. W. Bacteriophage taxonomy. **Microbiology Australia**. p. 90-94, may. 2011.

AGRAWAL, A; VANBROEKHOVEN, K; LAL, B. Diversity of culturable sulfidogenic bacteria in two oil–water separation tanks in the north-eastern oil fields of India. **Anaerobe**, v. 16, p. 12–18, feb. 2010.

ANGLY, E. F. et al. The Marine Viromes of Four Oceanic Regions. **PLoS Biology**, v. 4, p. 2121-2131, nov. 2006.

ASM. **MicrobeLibrary**. Disponível em:

<<http://www.microbelibrary.org/>>. Acesso em: 25 nov. 2015.

APHA, AWWA e WEF. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. American public health association: Washington, DC. 1995.

APHA, AWWA e WEF. **Standard methods for the examination of water and wastewater**, 14th ed, section 913: detection of viruses in water and wastewater. American public health association: Washington, DC. 1976.

AZEREDO, J.; SUTHERLAND, I. W. The use of phages for the removal of infectious biofilms. **Pharm Biotechnol**, v.9, p. 261-266, ago. 2008.

BAKER, B. J. et al. Related assemblages of sulphate-reducing bacteria associated with ultradeep gold mines of South Africa and deep basalt aquifers of Washington State. **Environmental Microbiology**, v. 4, n. 5, p. 267-277, 2003.

BALDWIN, D.; SUMMER, N. S. **Prevention and remediation of petroleum reservoir souring and corrosion by treatment with virulent bacteriophage**. Disponível em: <<https://www.google.com/patents/US8168419>>. Acesso em: 10 jun. 2017 .

BASTIN, E. S. The problem of the natural reduction of sulphates. **Am. Assoc. Petrol. Geol.**, v. 10, p. 1270-1299, dez. 1926.

BARTON, L. L.; FAUQUE, G. D. Biochemistry, Physiology and Biotechnology of Sulfate-Reducing Bacteria. **Advances in applied microbiology**, v. 68, p. 41-98, 2009.

BESSETI, J. Profiles in DNA: PCR inhibition. **Promega**, mar. 2007.

BLATTNER, F. R. et al. The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. **Science**, v. 277, mar. 1998.

BOIVIN, J. W. et al. An old and a new method of control for biofilm bacteria. In: **Proceedings volume, Annual NACE Corrosion Conference (Corrosion 92)**, Nashville, TN, 1992.

BOSCH, A.; ABAD, F. X.; PINTÓ, R. M. Human pathogenic viruses in the marine environment. Disponível em: <<http://www.ub.edu/virusenterics/wp-content/uploads/2013/06/Human-Enteric-Viruses-in-the-Marine-Environment.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2005.

BOSCH, A. et al. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. **Elsevier**, v. 19, p. 295-301, 2008.

BOYD, E. F.; BRUSSOW, H. Common themes among bacteriophage encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved. **Trends Microbiol**, v.10, p. 521-529, nov. 2002.

BOTTERO, S. et al. Biofilm development and the dynamics of preferential flow paths in porous media. **Biofouling: the journal of bioadhesion and biofilm research**, v. 29, n. 9, p. 1069-1086, set. 2013.

BREITBART, M. et al. Diversity and population structure of a near-shore marine-sediment viral community. **Proc. R. Soc. Lond.**, Ser. B., v. 27, p. 565-574, mar. 2004.

BREITBART, M. et al. Exploring the vast diversity of marine viruses. **Oceanography**, v. 20, n. 2, p. 135-138, 2007.

BUESA, J. et al. Evaluation of reverse transcription and polymerase chain reaction (RT/PCR) for the detection of rotaviruses: applications of the assay. **Res Viro**, v. 147, p. 353-361, 1996.

BURBANO-ROSETO, E. M. et al. Diversity of somatic coliphages in coastal regions with different levels of anthropogenic activity in São Paulo State, Brazil. **App. Environmental Microbiology**, v. 77, n. 12, p. 4208-4216, 2011.

CAMACHO, W. A. **Determinação da relação entre o carbono e o nitrogênio ideal para inibição da produção de sulfeto em um consórcio microbiano enriquecido a partir de água de produção de um reservatório de óleo offshore. 2015.** 76f. Dissertação (Mestre em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

CARTER, M. J. A Review: Enterically infection viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. **Journal App Microbiology**, v. 98, p. 1354-1380, 2005.

CHANG, L. T.; FARRAH, S. R.; BITTON, G. Positively charged filters for virus recovery from wastewater treatment plant effluents. **Appl. Environ. Microbiology**, v. 42, p. 921-924, 1981.

CHO, H. B. et al. Detection of adenovirus and enteroviruses in tap water and river water and river water by reverse transcription multiplex PCR. **Can J Microbiology**, v. 46, p. 417-424, 2000.

CASTRO, H.F.; WILLIAMS, N.H.; OGRAM, A. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. **Microbiology Ecology**, 31: 1-9, 2000.

CASTRIGNAMO, S. B.; NAGASSE-SUGAHARA, T. K.; The metagenomic approach and causality in virology. **Rev Saúde Pública**, 49:21, ago/2014.

CHANG, Y.; CHANG, Y. T.; CHEN, H. J. A method for controlling hydrogen sulfide in water by adding solid phase oxygen. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 478-483, 2007.

CHAPMAN, J. S. Biocide resistance mechanisms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, p. 133-138, mar. 2003.

CHEN, F. et al. Application of digital image analysis and flow cytometry to enumerate marine viruses stained with SYBR gold. **Appl Environ Microbiol**, v. 67, p. 539-545, 2001.

CLASSEN, M.; VAN ZYL, G. U.; PREISER, W. Extration buffer contaminated bacterially as a cause of invalid HIV-1 viral load results on the NucliSens EasyQ[®] system. **Journal of Virological Methods**, v. 150, p. 80-81, South Africa, 2008.

CURTIS, T. P.; SLOAN, W. T.; SCANELL, J. W. Estimating prokaryotic diversity and its limits. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 99, n. 16, p. 10494 – 10499, ago. 2002.

DAVIS, J. P.; STRUCHTEMEYER, C. G.; ELSHAHED, M. S. Bacterial communities associated with production facilities of two newly drilled thermogenic natural gas wells in the Barnett Shale (Texas, USA). **Microb Ecol**, v. 64, n. 4, p. 942-54, nov. 2012.

DECORATO, F. L. F. **Cinética da liberação de O₂ de oxidantes sólidos, contendo peróxido de magnésio, em condições abióticas e bióticas, para aplicação no controle do *souring* em reservatórios de petróleo em *offshore*. 2012.** 149f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em

Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

DE GROOT, M. **Probability and statistics**. 2 ed. New York: Addison-Wesley, 1986.

DJIKENG, A. et al. Metagenomic analysis of RNAviruses in a fresh water lake. **PLoS One**, v. 9, 2009.

DOE, U. **Modern shale gas development in the United States: a primer**. Office of Fossil Energy and National Energy Technology Laboratory, United States Department of Energy, 2009.

DO VAL, R. **Estudo da biodiversidade de colifagos somáticos isolados de ambientes aquáticos e de fezes humanas e animais**. 1997. 87f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

DUCKWORTH, D. H.; GLENN, J.; MCCORQUODALE, D. J. Inhibition of bacteriophages replication by extrachromosomal genetic elements. **Microbiol. Rev.**, v. 45, p. 52-71, 1981.

DUPONT. DuPont™ Vertrel® SFR. 2007. Disponível em: < https://www.chemours.com/Vertrel/en_US/assets/downloads/pdf/k22198_it.pdf > Acesso em: 08 fev. 2017.

ECKFORD, R.E.; FEDORAK, P.M. Planktonic nitrate-reducing bacteria and sulfate reducing bacteria in some western Canadian oilfield waters. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 83–92, ago/2002.

ELSGAARD, L.; D. PRIEUR. Thermophilic sulfate reduction in hydrothermal sediment of lake Tanganyika, East-Africa. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 1473-1480, 1994.

ESTES, M. K. et al. Rotavirus stability and inactivation. **J Gen Virol**, v. 43, p. 403-409, 1979.

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

FAUQUE; G. D.; BARTON, L. L. Hemoproteins in Dissimilatory Sulfate- and Sulfur-Reducing Prokaryotes. *Advances in Microbial Physiology*, v. 60, p. 1-90, 2012.

FINK, J. K. Defoamers. In: _____. **Petroleum engineer's guide to oil field chemicals and fluids**. Boston: Elsevier; Gulf Professional Publishing, 2011. p. 695.

FILÉE, J. et al. Marine T4-type bacteriophages, a ubiquitous component of the dark matter of the biosphere. **PNAS**, v. 102, p. 12471-12476, ago. 2005.

FONG, T. T.; LIPP, E. K. Enteric viruses of Humans and Animals in aquatic environments: health risks, detection and potential water quality assessment tools. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 69, n. 2, p. 357-371, 2005.

FUHRMAN, A. M., J. Impact of viruses on bacterial processes. In: KIRCHMAN, D. L. (Ed.). **Microbial Ecology of the ocean**. New York: Wiley-Liss, 2000. p. 327-350.

FULLER, N. J. et al. Occurrence of a sequence in marine cyanophages similar to that of T4 gp20 and its application to PCR – based detection and quantification techniques. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, p. 2051-2060, 1998.

GAJARDO, R.; DÍEZ, J. M.; JOFRE, J.; BOSCH, A. Genotyping of rotaviruses isolated from sewage. **Appl Environ Microbiol**, v. 61, p. 3460-3462, 1995.

GARDNER L. R.; STEWART, P. S. Action of glutaraldehyde and nitrite against sulfate-reducing bacterial biofilms. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 29, p. 354–360, jun. 2002.

GARRAFA, P. **Avaliação da qualidade virológica do efluente doméstico tratado e disponibilizado para reuso na cidade de São Paulo. 2009.** 146f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade de São Paulo – Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo. 2009.

GERBA, C. P. Applied and theoretical aspects of virus adsorption to surfaces. **Adv. Appl. Microbiol**, v. 30, p. 133-168, 1984.

GIEG, L. M.; JACK, T. R.; FOGHT, J. M. Biological souring and mitigation in oil reservoirs. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 92, p. 263-282, ago. 2011.

GIMENES, M. V. **Virioplântion na Amazônia: Estudo da diversidade dos vírus das famílias *Phycodnaviridae* e *Myoviridae* nos Rios Negro, Solimões e Cuieiras. 2010.** 115f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade de São Paulo – Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo. 2010.

GITTEL, A. et al. Prokaryotic community structure and sulfate reducer activity in water from high-temperature oil reservoirs with and without nitrate treatment. **Applied Environmental Microbiology**, v. 75, p. 7086-96, set. 2009.

GONÇALVES, G. A. M. **Utilização de bacteriófagos ambientais em associação com o bacteriófago P22 na redução de *Salmonella enteritidis* em ovos, frangos, carcaças e recortes. 2013.** 61f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu. 2013.

GREGORACCI, G. B. et al. Insights into the microbial and viral dynamics of a coastal downwelling-upwelling transition. **PloS One**, p. 1-14, set. 2015.

GUARDABASSI, L.; DALSGAARD, A.; SOBSEY, M. **Occurrence and survival of viruses in composted human faeces.** n. 32, Sustainable urban Renewal and Wastewater Treatment, Danish Environmental Protection Agency, Denmark, 2003.

HANDA, T.; LIM, C.; TAKASE, Y.; MIYANAGA, K.; TOMOE, Y.; TANJI, Y. Microbial and chemical characterizations of oil field water through artificial souring experiment. **J. Chem. Eng. Jpn**, v. 43, p. 792-797, 2010.

- HALON, G. W. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. **Internacional Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, p. 118-128, 2007.
- HILL, V.R.; POLACZYK, A. L.; KAHLER, A. M.; CROMEANS, T. L.; HAHN, D.; AMBURGEY, J. E. Comparasion of hollow-fiber ultrafiltration to the USEPA Viradel technique and USEPA method 1623. **Journal of Environmental Quality**, v. 38, p. 822 – 5, 2009.
- HU, J.; MIYANAGA, K.; TANJI, Y. Diffusion of bacteriophages through artificial biofilm models. **Biotechnol. Prog.**, v. 28, p. 319-326, abr. 2012.
- HUBERT, C.; VOORDOUW, G. Oil Field Souring Control by Nitrate-Reducing Sulfurospirillum spp. That Outcompete Sulfate-Reducing Bacteria for Organic Electron Donors. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, p. 2644-2652, abr. 2007.
- ICTV. The Universal Virus Database of the Internacional Committee on Taxonomy of Viruses, 2016. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/subcommittees.asp>>. Acesso em: 10 jun. 2017.
- IJZERMAN, M. M.; DAHLING, D. R.; FOUT, G. S. A metohd to remove environmental inhibitors prior to the detection of waterborne enteric viruses by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v. 63, p. 145 – 153, 1997.
- INVITROGEN. Invitrogen™ Platinum™ Taq DNA Polymerase. 14 jul. 2015. Disponível em: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Platinum_Taq_DNA_Polymerase_UG.pdf>. Acesso em: 04 jun. 2017.
- JAHN, J.; BOS, P. V. D; BROEKE, L. V. D. Evaluation of Membrane Processes for Acid Gas Treatment. In: **SPE International Production and Operations Conference & Exhibition**, Netherlands, 2012.
- JEANTHON, C. *et al.* *Thermodesulfobacterium hydrogeniphilum* sp nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, sulfate-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent at Guaymas Basin, and emendation of the genus *Thermodesulfobacterium*. **International**

Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 52, p. 765-772, 2002.

JENSEN, K. C. et al. Isolation and host range of bacteriophage with lytic activity against Methicilin-Resistente *Staphylococcus aureus* and potential use as a fomite decontaminant. **PLoS One**, p. 1-13, jul. 2015.

KAMIMURA, K.; ARAKI, M. Isolation and characterization of a bacteriophage lytic for *Desulfovibrio salexigens*, a Salt-Requiring, Sulfate-Reducing Bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 645-648, mar. 1989.

KARGBO, D. M.; WILHELM, R. G.; CAMPBELL, D. J. Natural gas plays in the Marcellus shale: Challenges and potential opportunities. **Environmental science & technology**, v. 44, p. 5679-5684, jun. 2010.

KASTER, K. M.; GRIGORIYAN, A.; JENNEMAN, G.; VOORDOUW G. Effect of nitrate and nitrite on sulfide production by two thermophilic, sulfate-reducing enrichments from an oil field in the North Sea. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p.195-203, 2007.

KELLAND, M.A. **Production chemicals for the oil and gas industry**. Boca Raton: CRC Press, p. 437, 2009.

KLEIMKEMPER, J. et al. Activity and diversity of sulfate-reducing bacteria in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1516-1523, 2002.

KNIEMEYER, O. et al. Anaerobic oxidation of short-chain hydrocarbons by marine sulphate-reducing bacteria. **Nature**, v. 449, n. 7164, p. 898-901, set. 2007.

KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. *Fields Virology*. 5 ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

LARSEN, J. B. et al. Phylogenetic analysis of members of the Phycodnaviridae virus family, using amplified fragments of the major capsid protein gene. **Applied Environmental Microbiology**, v. 74, p. 3048-3057, 2008.

LARSEN, A. et al. População dynamics and diversity of phytoplankton, bacteria and viruses in a seawater enclosure. *Marine Ecology Progress Series Journal*, v. 221, p. 47-57, 2001.

LIAMLEAM, W., ANNACHHATRE A. P. Electron donors for biological sulfate reduction. *Biotechnol Adv*, v. 25, p.452–463, out. 2007.

LYSHOLM, F. et al. Characterization of the viral microbiome in patients with severe lower respiratory tract infections, using metagenomic sequencing. *PLoS One*, 2012.

LOBOCKA, M. B. et al. Genome of Bacteriophage P1. *Journal of Bacteriology*, v. 186, n. 21, p. 7032-7068, nov. 2004.

MACHEL, H. G.; KROUSE, H. R.; SASSEN, R. Products and distinguishing criteria of bacterial and thermochemical sulfate reduction. *Applied geochemistry*, v.10, n. 4, p. 373-389, jul. 1995.

MADIGMAN, M. T. et al. *Microbiologia de Brock*. 12 ed. Artmed: Porto Alegre, 2010.

MAGOT, M.; OLLIVIER, B.; PATEL, B. K. C. Microbiology of petroleum reservoirs. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, v. 77, p. 103-116, 2000.

MARQUES, E. **Levantamento dos número e dos tipos de enterovírus em diferentes águas de esgoto da capital de São Paulo. 1987.** Dissertação (Mestre em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1987.

MAXWELL, S.; SPARK, I. Souring of reservoirs by bacterial activity during seawater waterfloodung. In: _____. **SPE INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON OILFIELD CHEMISTRY**, 2005, Houston. Proceedings. Richardson: Society of Petroleum Engineers, 2005.

MATEUS, L. et al. Efficiency of phage cocktails in the inactivation of *Vibrio* in aquaculture. *Aquaculture*, v. 424–425, p. 167–173, jan. 2014.

MATEJU, V. et al. Biological water denitrification – A review. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 14, p. 170-183, 1992.

MEHNERT, D. U.; STEWIEN, K. E. Detection and distribution of rotavirus in raw sewage and creeks in São Paulo, Brazil. **Appl Environ Microbiol**, v. 59, p. 140-143, 1993.

MEHNERT, D. U. et al. Detection of rotavirus in sewage and creek water: efficiency of the concentration method. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, p. 97-100, 1997.

MIRANDA-TELLO, et al. *Petrotoga mexicana* sp nov., a novel thermophilic, anaerobic and xylyanolytic bacterium isolated from an oil-producing well in the Gulf of Mexico. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 169-174, jan. 2004.

MOBIO. PowerSoil® DNA Isolation Kit. 2016. Disponível em: <<https://mobio.com/media/wysiwyg/pdfs/protocols/12888.pdf>>. Acesso em: 06 jun. 2017.

NELSON, D. Phages Taxonomy: we agree to disagree. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 729-731, 2004.

NOBLE, R. T.; FUHRMAN, J. A. Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. **Aquat Microb Ecol.**, v. 144, p. 113-118, fev. 1998.

OXFORD GENE TECHNOLOGY. Understanding and measuring variations in DNA sample quality. 23 agos. 2011. Disponível em: <http://ogt.com/resources/literature/483_understanding_and_measuring_variations_in_dna_sample_quality>. Acesso em: 23 ago. 2017.

PAULA, M. A. et al. Study of bacteriophages in water suspected of contamination by hepatitis A virus. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 69, n° 2, p. 267-269, 2010.

PAUL, J.H. et al. Distribution of viral abundance in the reef environment of Key Largo, Florida. **Appl. Environ. Microbiol**, v.59, p. 718-724, 1993.

PAUL, J. H. et al. Complete Genome Sequence of {phi} HSIC, a Pseudotemperate Marine Phage of *Listonella pelagia*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, p. 3311-3320, 2005.

PAUL, J. H. Prophages in marine bacteria: dangerous molecular time bombs or the key to survival in the seas? **The ISME Journal**, v. 2, p. 579-589, 2008.

PAULI, V. **Ocorrência e distribuição de genótipos G e P de rotavírus em efluente doméstico e córrego da cidade de São Paulo. 2003.** 121f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo. 2003.

PELCZAR, M. J; CHAN, E. C. S; KREIEG, N. R. **Microbiology: Concepts and applications.** New York: McGraw-Hill, 1993.

PEREYRA, L. et al. Detection and quantification of functional genes of cellulose-degrading, fermentative, and sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 76, p. 2192–2202, abr. 2010.

PHAN, T. G. et al.. The fecal viral flora of wild rodents. **PLoS Pathog.** 2011.

PIRANHA, J. M. et al. Faecal contamination (viral and bacteria) detection in Groundwater used for drinking purposes in São Paulo, Brazil. **Geomicrobiology**, v. 23, p. 279-283, 2006.

PRIMROSE, S. B. et al. Methods for studying aquatic bacteriophage ecology. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 43, p. 694-701, 1982.

PROCTOR, L. M.; FUHRMAN, J. A. Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria. **Nature**, v. 343, p. 60-62, 1990.

POSTGATE, J. R. **The sulphate-reducing bacteria.** 2 ed. Cambridge: Cambridge University Press, p. 641-705, 1984.

QUEIROZ, A. P. S. et al. Electropositive filter membrane as an alternative for the elimination of PCR inhibitors from sewage and water samples. **Applied and Environmental**, v. 67, p. 4614-4618, 2001.

RAO, V. C.; METCALF, T. G.; MELNICK, J. L. Development of a method for concentration of rotavirus and its application to recovery of rotavirus from estuarine water. **Applied Environmental**, v. 52, p. 484-488, 1986.

RITTMANN, B. E.; MCCARTY, P. L. **Environmental Biotechnology: Principles and Applications**. New York, McGraw-Hill, 2001.

ROCHE. Tth DNA Polymerase. 2013. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Roche/Bulletin/1/11480022001bul.pdf>>. Acesso: em 06 ju. 2017.

RODRIGUEZ, R. A.; PEPPER, I. L.; GERBA, C. P. Application of PCR-based methods to assess the infectivity of enteric viruses in environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 2, p. 297-307, 2009.

RÖLING, W. F. M.; HEAD, I. M.; LARTER, S. R. The microbiology of hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs: perspectives and prospects. **Res. Microbiol.**, v.154, p. 321-328, jun. 2003.

ROSARIO, K. et al. Metagenomic analysis of viruses in reclaimed water. **Environ Microbiol**, 11 p. 2806-2820, jun. 2009.

ROSETO, E. M. B. **Frequência e diversidade de colifagos somáticos isolados de amostras de água do mar, plâncton e bivalves da Baixada Santista, Canal de São Sebastião e Ubatuba. 2009.** 155f. Tese (Doutor em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2009.

ROSENBERG, E. et al. The phage-driven microbial loop in petroleum bioremediation. **App Microbiology and Blackwell**, v. 4, p. 467-472, 2010.

ROSSI, L. P. R.; ALMEIDA, R. C. C. Bacteriófagos para controle de bactérias patogênicas em alimentos. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 69, p. 151-156, 2010.

SABOUR, P. M.; GRIFFITHS, M. W. Bacteriophages in the control of food- and waterborne pathogens. **ASM Press**, Washington, DC., 2010.

SANTOS, F. M. et al. Discrimination of adenovirus types circulating in urban sewage and surface polluted waters in São Paulo city, Brazil. **Wat Sci Tech: Water Supply**, v. 4, p. 79-85, 2004.

SANDMEIER, H. S.; IIDA, S.; ARBER, W. DNA inversion regions Min of plasmid pI5B and Cin of bacteriophage PI: evolution of bacteriophage tail fiber genes. *Journal of Bacteriology*, v. 174, p. 3936 – 3944, 1992.

SASSAROLI, A. **Vírus da Hepatite A: a presença e identificação dos genótipos circulantes nas águas de esgoto e de superfície da cidade de São Paulo, Brasil. 2002.** 118f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2002.

SCHRADER, C. et al. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, p. 1014-1026, 2012.

SEELEY, N. D.; PRIMOSE, S. B. A Review: The isolation of bacteriophages from the environment. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 53, p. 1-17, 1982.

SHIELDS, P. A.; FARRAH, S. R. Concentration of viruses in beef extract by flocculation with ammonium sulfate. **App Environmental Microbiology**, v. 51, nº 1, p. 211 – 213, jan. 1986.

SHORT, S. M.; SHORT, C. M. Diversity of algal viruses in various North American freshwater environments. *Aquatic Microbial Ecology*, v. 51, p. 13 – 21, 2008.

SILLANKORVA, S. M. **Utilização de bacteriófagos no controle de células suspensas e biofilmes de *Pseudomonas fluorescens*.** 2004. 125f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) – Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Praga – Portugal. 2004.

SILLANKORVA, S.; NEUBAUER, P.; AZEREDO, J. Phage control of dual species biofilm of *Pseudomonas fluorescens* and *Staphylococcus lentus*. **Biofouling**, v. 26, p. 567-575, jun. 2010.

SILVA, M. C. A. **Avaliação da utilização de colifagos como indicadores virais a partir da análise de enterovírus e adenovírus em efluentes tratados por diferentes processos biológicos.** 2010. 83f. Dissertação (Mestre em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental) – Instituto de Pesquisas Hidráulicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2010.

SILVA, M. L. B. et al. Effects of Nitrate Injection on Microbial Enhanced Oil Recovery and Oilfield Reservoir Souring. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, ago. 2014.

SOBSEY, M. D.; JONES, B. L. Concentration of poliovirus from tap water using positively charged microporous filters. **Appl Environ Microbiol**, v. 37, p. 588-595, 1979.

STRUCHTEMEYER, C. G.; DAVIS, J. P.; ELSHAHED, M. S. Influence of the drilling mud formulation process on the bacterial communities in thermogenic natural gas wells of the Barnett Shale. **Appl Environ Microbiol**, v. 77, n. 14, p. 4744-4753, jul. 2011.

SULAKVELIDZE, A.; ALAVIDZE, Z.; MORRIS, J. G. **Bacteriophage therapy, Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, p. 649-659, mar/2001.

SULLIVAN, M. B.; WATERBURY, J. B.; CHISHOLM, S. W. Cyanophages infecting the oceanic cyanobacterium *Prochlorococcus*. **Nature**, v. 424, p. 1047-1051, 2003.

SUMMER, E. L. et al. Phages of sulfate reducing bacteria isolated from high saline environment. In: Nace Internacional Corrosion 2011 Conference & Expo, 2011, Texas. **Paper...**, Texas: Nace Internacional, 2011. p. 1-12.

SUN, L. et al. Virus grows tube to insert DNA during infection then sheds it. **Nature**, v. 505, p. 432-435, jan. 2014.

SUTTLE, C. A.; CHAN, A. M.; COTTRELL, M. T. Infection of phytoplankton by viruses and reduction of primary productivity. **Nature**, v. 347, p. 467-469, 1990.

SUTTLE, C. A. Marine viruses: major players in the global ecosystem. **Nature Reviews - Microbiology**, v. 5, p. 801-812, out/2007.

TANG, K.; BASKARAN, V.; NEMATI, M. Bacteria of the sulphur cycle: an overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. **Biochem Eng J.**, v.44, p. 73-94, dez.2009.

TANJI, Y. et al. Biological souring of crude oil under anaerobic conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 90, p.114–120, jun. 2014.

TEIXEIRA, J.; SCHMIDELL, W.; ZDRADEK, C. P. Metodologia para determinação de sólidos suspensos totais (SST), para sistemas de tratamento biológico de águas residuárias, utilizando microondas. In: **Congresso Brasileiro de Química**, 48., 2008, Rio janeiro, 2008.

TYUTIKOV, F. M. et al. Bacteriophages of Methanotrophic Bacteria. **Journal of Bacteriology**, p. 375-381, out. 1980.

VANCE, I. et al. **American Society for Microbiology**. Washington: DC, 2005.

VIRALZONE. P1virus. 2017. Disponível em: <http://viralzone.expasy.org/505?outline=all_by_protein>. Acesso em: 10 jul. 2017.

VOLK, H.; HENDRY, P., 3^o Oil Recovery: Fundamental Approaches and Principles of Microbially Enhanced Oil Recovery. In: TIMMIS, K. N. **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**. 2010.

WAGNER, E. W.; HEWLETT, M. **Basic Virology**. New York: Blackwell Science, 1999.

WALSHE, G. E.; PANG, L.; FLURY, M.; CLOSE, M. E.; FLINTOFT, M. Effects of pH, ionic strength, dissolved organic matter, and flow rate on the co-transport of MS2 bacteriophages with kaolinite in gravel aquifer media. **Water Res.**, v. 44, p. 1255-1269, 2010.

WEINBAUER, M. G. Ecology of prokaryotic viruses. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 28, p. 127-181, 2004.

WIDDEL, H. U. Correlations between Atomic Oxygen Airglow and Radiowave Absorption in Winter. **Journal of Atmospheric and Terrestrial Physics**, v. 42, p.331-337, 1980.

WILKES, H. et al. Anaerobic degradation and carbon isotopic fractionation of alkylbenzenes in crude oil by sulphate-reducing bacteria. **Organic Geochemistry**, v. 31, p. 101-115, 2000.

WILLIAM, W. W.; MACKEY, K.; CHOMCZYNSKI P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. **Bio Techniques**, v. 22, p. 474-481, mar. 1997.

WILLIAMSON, K. E.; WOMMACK, K. E.; RADOSEVICH, M. Sampling natural viral communities from soil for culture-independent analyses. **App. Environmental Microbiology**, v. 69, n. 11, p. 6628-6633, nov. 2003.

WYN-JONES, A. P.; SELLWOOD, J. Enteric viruses in the aquatic environment. **Journal Applied Microbiology**, v. 91, p. 945-962, 2001.

WOMMACK, K. E.; HILL, R. T.; COLWELL, R. R.; A simple method for the concentration of viruses from natural water samples. *Journal of Microbiological Methods*, v. 22, p. 57-67, 1995.

WOMMACK, K.; COLWELL, R. Viroplankton: viruses in aquatic ecosystems. **Microbial. Mol. Boil. Rev.**, v.64, n.1, p.69-114, 2000.

ZAKKOUR, P.; COOK, G. CCS Roadmap for Industry: High-purity CO₂ sources. Sectoral Assessment-Final Draft Report. **Global Technology Roadmap for CCS in Industry**. United Nations Industrial Development Organization, Vienna, Austria, 2010.

ZARASVAND, K. A.; RAI, V. R. Microorganisms: Induction and inhibition of corrosion in metals. **Intern Biodeterioration and Biodegradation**, v. 87, p. 66-74, 2014.

ZYMO RESEARCH. Instruction Manual: ZR Viral DNA/RNA Kit™. Disponível em: <<http://www.zymoresearch.com/downloads/dl/file/id/113/d7020i.pdf>>. Acesso em: 04 jun. 2017.

ZHONG, Y. et al. Phylogenetic diversity cyanophage isolates and natural virus communities a revealed by sequences of viral capsid assembly protein gene g20. *Applied Environmental Microbiology*, v. 68, p. 1576-1584, 2002.

ANEXOS

ANEXO A – Meio de Cultura LB-Ágar

Diluir, em 900 mL de água ultrapura (MilliQ[®]), 20 g de LB (Life Technologies) e 08 g de Agar Bacteriological (Acumedia), e manter sob agitação, utilizando agitador magnético até que forme uma solução homogênea.

Transferir a solução para um balão volumétrico e avolumar para 1 L e, então, transferir para frascos adequados para o processo de esterilização. A solução foi autoclavada a 121°C por 15 minutos. Manter em banho-maria a 60°C, até o momento de uso.

Distribuir aproximadamente, 10 mL de meio, em cada placa de Petri, fazer o processo em fluxo laminar, para não ocorrer contaminação. Esperar o meio solidificar e então armazenar as placas a 4°C, até o momento de uso.

ANEXO B – Meio de Cultura LB

Diluir em 900 mL de água ultrapura (MilliQ[®]), 20 g de LB (Life Technologies), manter sob agitação, utilizando agitador magnético, até que formar uma solução homogênea.

Transferir a solução para um balão volumétrico e avolumar para 1 L e, então transferir para frascos de vidro que suportem alíquotas de 10 mL.

O meio de cultura foi autoclavado a 121°C por 15 minutos. Manter a 4°C, para uso posterior.

ANEXO C – Meio de cultura LB composto

O meio de cultura LB composto é composto por 20g/L de LB (Life Technologies), suplementados com 5 mM CaCl_2 e 0,2% de glicose.

Primeiramente, diluir o LB em 500 mL de água ultrapura (MilliQ[®]) e, então acrescentar 5 mM CaCl_2 e 0,2% de glicose, manter sob agitação, utilizando agitador magnético, até que formar uma solução homogênea.

Utilizando, um balão volumétrico de 1 L, avolumar a solução. Separar a solução em alíquotas de 10 mL em frascos de vidro, para então autoclavar a 121°C por 15 minutos.

Acondicionar os meios prontos a 4°C, até o momento de uso.

ANEXO D – Meio de Cultura Top-Ágar

O primeiro passo é preparar o meio de cultura LB-Ágar, então em 900 mL de água ultrapura (MilliQ[®]) diluir, 20 g de LB (Life Technologies) e 08 g de Agar Bacteriological (Acumedia), manter sob agitação, utilizando agitador magnético, até que formar uma solução homogênea.

Transferir a solução para um balão volumétrico e avolumar para 1 L e, então transferir para frascos adequados para o processo de esterilização. A solução foi autoclavada a 121°C por 15 minutos. Manter em banho-maria a 60°C até o momento de uso.

Distribuir, aproximadamente, 10 mL de meio em cada placa de petri e fazer o processo em fluxo laminar para não ocorrer contaminação. Esperar o meio solidificar.

Sobre o meio LB-Ágar solidificado, adicionar 5 mL de Top-Ágar, o qual é preparado da seguinte forma: diluir, em 900 mL água ultrapura (MilliQ[®]), 20 g de LB (Life Technologies) e 08 g de Agar Bacteriological (Acumedia), manter sob agitação utilizando agitador magnético, até que forme uma solução homogênea. Avolumar para 1 L com o auxílio de balão volumétrico, autoclavar a 121°C por 15 minutos. É necessário manter o meio a 60°C, utilizando-se banho-maria.

Suplementar o meio com 5 mM CaCl₂, 0,1 M MgSO₄ e 0,2% de glicose e, então, distribuir o meio Top-Ágar sobre o LB-Ágar em cada placa de Petri. Esperar o meio solidificar e as placas devem ser utilizadas imediatamente.

ANEXO E – Remoção de Sais do DNA

Após a quantificação e análise do DNA extraído, utilizando o NanoDrop 200C, observou-se a presença de sais nas amostras, conforme apresentado na Tabela 10, então as amostras foram lavadas com 500 μ L de solução de citrato de sódio 0,1 M e 10 % de etanol, e incubado por 30 minutos a 25 °C. As amostras foram novamente centrifugadas a 5.000 \times g por 5 minutos a 4 °C. Repetiu-se o por mais duas vezes.