

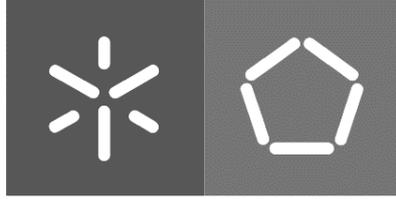


Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Marta Filipa Ribeiro Leite

**Avaliação do potencial antimicrobiano da
endolisina PlyPI23 derivada de um
Bacteriófago de *Paenibacillus larvae* para o
controlo da Loque Americana**

Outubro 2014



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Marta Filipa Ribeiro Leite

**Avaliação do potencial antimicrobiano da
endolisina PlyPI23 derivada de um
Bacteriófago de *Paenibacillus larvae* para o
controlo da Loque Americana**

Tese de Mestrado
Mestrado em Bioengenharia

Trabalho realizado sob a orientação da
Doutora Ana Oliveira

e a coorientação da
Professora Doutora Joana Azeredo

Outubro 2014

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO
DE QUALQUER PARTE DESTA TESE

Universidade do Minho, ___/___/_____

Assinatura: _____

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que de uma forma directa ou indirecta contribuíram para a realização desta dissertação.

Desde já gostaria de agradecer a Doutora Joana Azeredo e a Doutora Ana Oliveira a orientação e disponibilidade durante este processo. Em particular à Ana Oliveira por toda a ajuda, incentivo, confiança, paciência e principalmente simpatia que demonstrou o longo deste trabalho, factores determinantes para a realização desta dissertação.

Gostaria de agradecer igualmente a todos os colegas do Laboratório de Microbiologia Aplicada II da Universidade do Minho por toda a ajuda e pelo ótimo ambiente de trabalho proporcionado, em particular agradecer ao Luis, ao Silvio e a Graça por toda a ajuda e disponibilidade demonstrada.

Às “companheiras de luta” Patrícia e Márcia por todos os momentos compartilhados nos nossos serões sempre divertidos, por toda ajuda, incentivo e amizade “estão num fundo do bico do meu coração”.

À Maria João pela amizade e ajuda prestada ao longo deste processo pela partilha das noites a escrever e pelos momentos divertidos que compartilhamos que fizeram com que todo este processo fosse mais fácil.

Obrigada aos meus amigos especialmente à Marta e a Rosa por estarem sempre presentes e pela compreensão sempre demonstrada.

Gostaria de agradecer ainda aos meus pais e irmão por tudo o apoio, incentivo, compreensão, e paciência demonstrada mesmo nos momentos de maior stresse e preocupação.

Por último agradecer também ao departamento de engenharia biológica da Universidade do Minho por ter cedido as suas instalações para a realização deste trabalho experimental.

A todos um muito obrigado!

Resumo/Abstract

RESUMO

A Loque Americana (LA) é uma doença causada pela *Paenibacillus larvae*, uma bactéria gram-positiva formadora de esporos, que são a forma infetante das primeiras fases larvares das abelhas. Esta doença leva à destruição de colónias inteiras, causando graves perdas financeiras e da população de abelhas, em todo mundo. A restrição à presença de antibióticos no mel imposta pela legislação Europeia, e o aparecimento de resistências aos antibióticos mais usados, dificulta o seu uso no tratamento da LA, tornando urgente desenvolver métodos antimicrobianos alternativos. O uso de endolisinas tem sido considerado uma boa alternativa aos antibióticos, especialmente em bactérias gram-positivas. Neste trabalho avaliou-se o efeito antimicrobiano da endolisina PlyPI23, uma *N*-acetylmuramoyl-*L*-alanine amidase derivada do fago philBB_PI23, no controlo de *P. larvae*. Após clonagem, expressão e purificação da PlyPI23, realizaram-se ensaios *in vitro* de modo a determinar as condições de reação ótimas e avaliar a sua capacidade antimicrobiana. Todas as estirpes identificadas como *P. larvae* (71.2 % pertencentes ao genótipo ERIC I e 19 % ao ERIC II) foram sensíveis à PlyPI23 com um maior espetro de ação do que o fago philBB_PI23 (76.2 %). A PlyPI23 apresentou valores de pH ótimo a pH 3 e muito elevado a pH 4 (em média, 56.5 % da atividade apresentada em pH3), que correspondem a níveis de pH encontrados no mel, néctar, pólen e geleia real. Quando suplementada com 200 mM NaCl a pH 7 (pH semelhante ao das larvas, 6.8), apresentou resultados de atividade mais elevados do que sem a adição do sal, (em média, com 0 mM NaCl observou-se 74.6 % da atividade obtida com 200 mM NaCl). Ao contrário, a adição do ião Zn^{2+} ao tampão de reação não melhorou a atividade. Relativamente à avaliação do efeito antimicrobiano da PlyPI23, verificou-se que uma concentração de 0.2 μM foi suficiente para diminuir a população de *P. larvae* em cerca de 4 log. Partindo de 10^4 CFU.ml⁻¹, que se assemelha às concentrações de *P. larvae* encontradas em larvas infetadas, a enzima reduziu a bactéria para níveis não detetáveis. No que diz respeito aos testes de estabilidade em substâncias importantes a ter em conta para a aplicação *in vivo*, a enzima, manteve a atividade quando sujeita ao contato com, sacarose, e melhorou o seu efeito antibacteriano após contato com geleia real (aumento médio de 64.9 % de atividade após 30 min) e com homogeneizado de larva (diminuição mais 1 log de atividade após 15 min), relativamente à ação em tampão Tris pH7, 200 mM NaCl. A PlyPI23 é, até à data, a primeira endolisina derivada de um fago de *P. larvae* a ser reportada, e os resultados obtidos revelaram um elevado potencial para integrar um produto comercial para o controlo da loque americana.

ABSTRACT

The American foulbrood (AFB) is a disease caused by *Paenibacillus larvae*, a gram-positive spore-forming bacteria. The spores are the infective form, of the first larval stages of honeybees. This disease leads to the destruction of entire colonies, causing serious financial losses and the decline in bee population worldwide. The restriction on the presence of antibiotics in honey imposed by European legislation, and the emergence of bacterial resistance to commonly used antibiotics, hamper its use in the AFB treatment and makes urgent the development of alternative antimicrobial methods. The use of endolysins, bacteriophage-derived enzymes, has been considered a good alternative to antibiotics, particularly in gram-positive bacteria. In this work, the antimicrobial effect of an endolysin, PlyPI23, to control *P. larvae* was evaluated. PlyPI23, was identified as an *N*-acetylmuramoyl-*L*-alanine amidase and derived from phage philBB_PI23. After cloning, expression and purification of the enzyme, *in vitro* assays were performed to determine the optimal reaction conditions and to evaluate the antimicrobial performance. All the strains identified as *P. larvae* (71.2 % belonging to genotype ERIC I and 19 % to ERIC II) were sensitive to PlyPI23 with a broader spectrum of action than philBB_PI23 phage (76.2 %). PlyPI23 presented the optimum pH at pH 3 and very high activity at pH 4 (56.5 % of the activity observed in pH 3, on average), which correspond to the pH levels found in honey, nectar, pollen and royal jelly. When PlyPI23 acted in Tris pH 7 supplemented with 200 mM NaCl (pH similar to larvae, 6.8), results showed higher activity than without the addition of salt, (on average, with 0 mM NaCl was observed 74.6% of the activity obtained with 200 mM NaCl). In contrast, the addition of Zn²⁺ to the reaction buffer did not improve the activity. Relatively to the antimicrobial effect of PlyPI23, it was found that a concentration of 0.2 μM was sufficient to decrease the population of *P. larvae* in about 4 log. Starting from a concentration of 10⁴ CFU.ml⁻¹, which is similar to concentrations found in infected larvae, the enzyme reduced the bacteria to non-detectable levels. Concerning to stability tests when the enzyme was in contact with substances that are important to consider for *in vivo* applications, it was observed that the enzyme remained active after contact with sucrose, and improved its antibacterial effects when in contact with royal jelly (average increase of 64.9% activity after 60 min) and larvae homogenized (decrease of 1 log of activity after 15 min), comparing with the action in Tris pH 7, 200 mM NaCl. PlyPI23 is, to this date, the first *P. larvae* phage- derived endolysin that was reported, and the results revealed a high potential of the enzyme to comprise a commercial product for the control of AFB.

Índice

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO/ABSTRACT	vii
LISTAS PUBLICAÇÕES, AVREVIATURAS, FIGURAS, TABELAS.....	xvii
LISTAS PUBLICAÇÕES	xix
LISTA DE ABREVIATURAS	xx
LISTA DE FIGURAS	xxi
LISTAS DE TABELAS	xxiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Loque Americana	4
1.1.1. Processo de infecção das larvas por <i>Paenibacillus larvae</i>	5
1.1.2. Evolução da classificação da <i>Paenibacillus larvae</i>	7
1.1.3. Novas estratégias de tratamento da LA.....	8
1.2. Bacteriófagos.....	9
1.2.1. Ciclo de Vida.....	11
1.2.2. Importância e aplicação dos fagos.....	12
1.3. Endolisinas	14
1.3.1. Estrutura, função e modo de ação das endolisinas.	15
1.3.2. Aplicações terapêuticas.....	18
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
2.1. Isolamento caracterização de estirpes de <i>Paenibacillus larvae</i>	23
2.1.1. Isolamento de estirpes de <i>P.larvae</i>	23
2.1.2. Identificação das estirpes de <i>P. larvae</i> 16s PCR.....	23
2.1.3. Genotipagem das estirpes de <i>P. larvae</i>	24
2.2. Seleção de Bacteriófagos.....	25

2.2.1.	Isolamento de bacteriófagos	25
2.2.2.	PhilBB_PI23	26
2.2.2.1.	Produção	26
2.2.2.2.	Espetro lítico	27
2.3.	Obtenção da endolisina através do fago PhilBB_PI23	28
2.3.1.	Análise Bioinformática	28
2.3.2.	Clonagem expressão e purificação da PlyPI23	28
2.3.2.1.	Construção do plasmídeo recombinante	28
2.3.2.2.	Transformação	30
2.3.2.3.	Inserção em células competentes BL21	31
2.3.3.	Expressão e purificação da PlyPI23.....	31
2.3.3.1.	Expressão	31
2.3.3.2.	Purificação	31
2.3.3.3.	Análise em Gel SDS-Page	32
2.4.	Caracterização e avaliação da atividade lítica.....	33
2.4.1.	Testes de estabilidade da PlyPI23 a diferentes temperaturas.....	34
2.4.1.1.	Efeito do pH	34
2.4.1.2.	Efeito da força iônica	34
2.4.1.3.	Efeito Zinco	34
2.4.1.4.	Espetro lítico PlyPI23.....	34
2.4.1.5.	Efeito da sacarose, geleia real e do suco de larva.....	35
2.4.1.6.	Efeito da concentração inicial de bactéria e da concentração de endolisina	36
2.5.	Análise estatística	36
3.	RESULTADOS.....	37
3.1.	Isolamento e caracterização das estirpes de <i>Paenibacillus larvae</i>	39

3.2.	Isolamentos de novos bacteriófagos	39
3.3.	Espetro lítico do fago philBB_PI23	39
3.4.	Obtenção da endolisina através do fago philBB_PI23	39
3.4.1.	Análise Bioinformática.....	39
3.4.2.	Clonagem, expressão e purificação da endolisina PlyPI23	41
3.4.3.	Caracterização e avaliação da atividade lítica.....	42
3.4.3.1.	Testes de estabilidade da PlyPI23 a diferentes temperaturas	43
3.4.3.2.	Efeito do pH.....	44
3.4.3.3.	Efeito da força iónica.....	45
3.4.3.4.	Efeito adição ião zinco.....	46
3.4.3.5.	Espetro lítico	47
3.4.3.6.	Efeito da sacarose, geleia real e suco de larva na atividade da PlyPI23.....	49
3.4.3.7.	Concentração inicial de bactéria e concentração de PlyPI23	53
4.	DISCUSSÃO	57
5.	CONCLUSÃO.....	65
6.	PERSPECTIVAS FUTURAS	69
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
	ANEXOS	85

Lista de publicações,
abreviaturas, figuras, tabelas

PUBLICAÇÕES NO ÂMBITO DESTE TRABALHO

Artigo Submetido

- Oliveira, Ana; Leite, Marta; Melo, L.D.R.; Santos, S.B.; Azeredo, J., 2014. The first *Paenibacillus larve* bacteriophage endolysin (PlyPI23) - potencial application in American foulbrood control.

Posters em conferências

- Oliveira, Ana; Leite, Marta; Melo, L.D.R.; Santos, S.B.; Azeredo, J. Effect of the phage-derived endolysin PlyPI23 in controlling *Paenibacillus larvae* spread in apiaries - in vitro studies. 3rd International Conference on Responsible Use of Antibiotics in Animals. Amsterdão, Holanda, 139-139, 2014
- Oliveira, Ana; Leite, Marta; Melo, L.D.R.; Santos, S.B.; Azeredo, J. Characterization of PlyPI23, an endolysin from a *Paenibacillus larvae* bacteriophage. Viruses of Microbes - EMBO Conference. Vol. III, Brussels, Belgium, 16-20 July, 277-277, 2014

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN - Ácido desoxirribonucleico

ARN - Ácido ribonucleico

CBDs - domínio de ligação à parede celular

CEB - Centro engenharia biológica

CFU- Unidades formadoras de colonias

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

Fagos - Bacteriófagos

GlcNAc - N-acetilglucosamina

HL - Homogeneizado larvar

IPTG - isopropil-b-D-tiogalactopiranosido

LA - Loque Americana

MurNAc - Ácido N-acetilmurâmico

PBS - Tampão fosfato-salino

PFGE - Electroforese em gel de campo pulsado

PG - peptodoglicano

rep-PCR - PCR de elementos repetitivos

TA - Temperatura Ambiente

TAE - Tris-Acetato EDTA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Representação esquemática do ciclo de infecção das larvas de abelhas pela estirpe P. larvae (adaptado de Djukic <i>et al.</i> , 2014).	6
Figura 1. 2. Estrutura morfológica de um fago tipo T4 (adaptado de Todar <i>et al</i> /2012).	10
Figura 1.3. Descrição esquemática do ciclo lítico e lisogênico: (1) Adsorção e injeção do ADN do fago; (2) replicação de ADN; (3) produção da cauda e cabeça; (4) síntese de holinas e lisinas; (5) Empacotamento do ADN; (6) conclusão do fago; (7) rompimento da parede celular e a libertação de novos fagos; (8) circularização ADN de fagos; (9) a integração do ADN do fago no genoma do hospedeiro (adaptado de Matsuzaki <i>et al.</i> , 2005).	12
Figura1.4. Representação esquemática da atuação das endolisinas na célula bacteriana. Holinas (a azul) inserem-se na membrana citoplasmática formando poros. As endolisinas (a vermelho) passam por esses poros para aceder ao peptidoglicano, provocando lise das células 1- atuação endógena dentro para fora; 2- atuação exógena em células gram-positivas (adaptado de Loessner <i>et al.</i> , 2005).	15
Figura 1.5. Representação esquemática do domínio catalítico (na região N-terminal) e do domínio de ligação à parede celular (na região C-terminal) (adaptado de Fischetti <i>et al.</i> , 2008).	16
Figura1.6. Representação esquemática da estrutura bacteriana das células gram-positivas e gram-negativas. Ação da endolisina sobre o peptidoglicano em bactérias gram-positivas: 1) N-acetil-bD-glucosaminidase; 2) N-acetil-b-D-muramidase; 3) transglicosilase lítica; 4) N-acetylmuramoyl- L-alanina-amidase; 5) a endopeptidase- L-glutamato alanoyl-D; 6) endopeptidase D-alanil-glicil; 7) endopeptidase D-alanina-D-meso DAP e 8) D- glutamil-m-DAP endopeptidase (adaptado Oliveira <i>et al.</i> , 2012).	17
Figura 3.1. a) Alinhamento da sequência proteica da endolisina através do programa pfam (i) e do Blastp ii). b) Representação esquemática da organização dos domínios da endolisina.....	40
Figura 3.2. Gel de SDS-PAGE carregado com diferentes fracções resultantes da expressão da PlyPI23 à temperatura de a) 16 °C e b) 30 °C. P- Marcador molecular; 1-Amostra; 2- Lavagem com 20 mM de imidazol; 3- Lavagem com 40 mM de imidazol 4, 5, 6 - fracções eluídas em 300 mM imidazol.....	42
Figura 3.3. Atividade relativa (%) da PlyPI23 nas concentrações de 1, 2 e 3 µM, obtida por variação da DO _{620nm} , aos 120 min de reação. A atividade relativa de referência (100 %) correspondeu a 60 % de atividade lítica (figura A7.1 Anexo VII).	43

Figura 3.4. Atividade relativa (%) para os valores de pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, e 9, após 60 e 120min de reação. A atividade relativa de referência (100 %) correspondeu a cerca de 80 % de atividade lítica (figura A7.2 Anexo VII).....	45
Figura 3.5. Efeito da adição de 0, 50, 100, 150 e 200 mM NaCl a soluções com pH 5,6 e 7 sobre a atividade relativa (%) da endolisina. Dados relativos aos 120min de reação. Dados relativos aos 120min de reação. A atividade relativa de referencia (97 %) correspondeu a 50.4 % de atividade lítica (figura A7.3 Anexo VII).....	46
Figura 3.6. Atividade relativa (%) da PlyPI23 com e sem a adição de Zn ²⁺ (0.1 mM), em soluções de pH 5, 6 e 7. Dados relativos aos 120 min de reação. Dados relativos aos 120 min de reação. A atividade relativa de referência (100 %) correspondeu a 48.46 % de atividade lítica (figura A7.4 Anexo VII).....	47
Figura 3.7. Atividade relativa (%) da PlyPI23 após contato com 50 % sacarose e posterior incorporação na solução tampão pH 7 200 mM NaCl. A atividade relativa de referência (100 %) correspondeu a 60 % de atividade lítica (figura A7.5 Anexo VII).....	49
Figura 3.8. Atividade antimicrobiana da PlyPI23 em Tris pH7, 200mM NaCl, comparativamente com Tris pH7 200 mM NaCl + Geleia real, ao longo de 120 min e monitorizada por variação da DO _{620nm}	50
Figura 3.9. Atividade antimicrobiana da PlyPI23 em Tris pH7, 200 mM NaCl em comparação com a PlyPI23 em HL1 e com do próprio HL1. Ensaio realizado ao longo de 120 min, e por variação da concentração em CFU.ml ⁻¹ . *limite de detecção 100 CFU/ml.	52
Figura 3.10. Atividade antimicrobiana da PlyPI23 em Tris pH7, 200 mM NaCl em comparação com a PlyPI23 em HL2 e com do próprio HL2. Ensaio realizado ao longo de 120 min, e por variação da concentração em CFU.ml ⁻¹ . *limite de detecção 100 CFU/ml.	52
Figura 3.11. Ação da PlyPI23 ao fim de seis horas a 37 °C em contato com uma solução de pH 7 200 mM NaCl com 50% de sacarose e geleia real 1:1 (m/v) em comparação com a ação da PlyPI23 em pH 7 200 mM NaCl. Resultados obtidos por monitorização da DO _{620nm}	53
Figura 3.12. Variação da concentração celular ao longo do tempo, usando uma concentração inicial de bactéria de 10 ⁶ CFU.ml ⁻¹ após adição de 2.0 e 0.2 µM de endolisina. *limite de detecção 100 CFU/ml; **limite de detecção 10 CFU/ml.	54
Figura 3.15. Variação da concentração celular ao longo do tempo, usando uma concentração inicial de bactéria de 10 ⁶ CFU.ml ⁻¹ após com adição de 2.0 e 0.2 µM de endolisina.	55

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1.1. Principais características dos 4 genótipos de <i>P.larvae</i> (adaptado de Generesch <i>et al.</i> , 2009)....	8
Tabela 2.1 <i>Primer's</i> usados para a identificação e genotipagem de estirpes <i>P. larvae</i> por PCR.....	24
Tabela 2.2. <i>Primer's</i> usados durante o processo de clonagem da endolisina.....	28
Tabela 3.1. Homologia da sequência proteica da PlyPI23 através do Blastp, para: <i>Paenibacillus larvae</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Bacillus anthracis</i> e fagos de <i>Bacillus</i> sp.	41
Tabela3.2. Atividade lítica da PlyPI23 a diferentes temperaturas e ao longo do tempo. – perda de atividade da enzima ; - enzima activa.	44
Tabela 3.3. Espectro lítico do fago philBB_PI23 e da PlyPI23 nas estirpes de <i>P. larvae</i> e em algumas bactérias do género <i>Bacillus</i> e <i>Lactobacillus</i>	48
Tabela 3.4. Atividade antimicrobiana da PlyPI23 em Tris pH7, 200mM NaCl em comparação com Tris pH7, 200 mM NaCl após incubação em geleia real (30 min) e com a atividade antimicrobiana da própria geleia real. Ensaio realizado ao longo de 120 min, e por variação da concentração em CFU.ml ⁻¹ , a partir de uma concentração inicial de bactéria 10 ⁷ CFU.ml ⁻¹	51

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A apicultura é um setor agrícola, com grande importância econômica e social. Para além disso as abelhas têm um papel essencial ao nível da preservação e sustentabilidade dos ecossistemas naturais, devido ao seu papel na polinização e fertilização das plantas (Arabia e Babbay, 2011).

De acordo com Gallai *et al.*, (2009), cerca de 153 biliões de euros foi o valor estimado a nível mundial para a produção de produtos derivados da polinização de plantas em 2005. São vários os produtos resultantes da apicultura, como é o caso da própolis, da cera, da geleia real ou do mel, e todos eles têm várias aplicações, como para o consumo humano, a indústria farmacêutica, os produtos cosméticos, entre outros. No entanto, o mel tem sido o mais valorizado e rentável para os apicultores (Arabia e Babbay, 2011).

Apesar da importância da apicultura, nos últimos anos tem-se verificado a diminuição no número de abelhas polinizadoras não só devido a doenças (bacterianas, virais e parasitárias) que afetam as colmeias mas também ao uso intensivo de pesticidas, antibióticos e agrotóxicos usados na agricultura e no combate a doenças (Gallai *et al.*, 2009; Arabia e Babbay, 2011). O uso prolongado destes produtos tem como consequência a diminuição da duração da vida das abelhas, bem como o desenvolvimento de resistências a agentes patogénicos. Por estas razões, torna-se necessário e urgente desenvolver estratégias sustentáveis, eficientes e ecológicas para o controlo dessas doenças, tais como estratégias de gestão e criação de linhagens de abelhas com resistência natural a doenças e do uso de agentes de controlo de origem biológica. Relativamente aos últimos, espera-se que para além de combater as doenças, melhorem a qualidade dos produtos de apicultura como é o caso do mel, evitando a presença de resíduos químicos (Arabia e Babbay, 2011).

Uma das infeções bacterianas mais frequentemente e devastadoras na Apicultura é a loque americana, uma doença que afeta as larvas das abelhas.

1.1.Loque Americana

A Loque Americana (LA) é uma doença causada pela bactéria formadora de esporos *Paenibacillus larvae* (Govan *et al.*, 1999). O único hospedeiro conhecido desta bactéria é a abelha *Apis mellifera*, o inseto polinizador mais importante em todo o mundo (Forsgren *et al.*, 2009).

Esta doença afeta as fases larvares das abelhas e por isso mesmo é considerada uma doença de criação. Segundo Alippi, 1992, foi isolada pela primeira vez em 1989 na Argentina, e é considerada umas das mais devastadoras doenças das abelhas capaz de destruir colónias, causando graves perdas financeiras e um decréscimo acentuado na população de abelhas e na produção de mel (Forsgren *et al.*, 2009; Antúnez *et al.*, 2007).

A LA é uma doença bastante comum nos Estados Unidos, Europa, Austrália sendo também encontrada em países como a Argentina, Uruguai e Brasil. Em Portugal esta doença tem ocorrência em regiões húmidas propícias à proliferação da *Paenibacillus larvae*, e é de declaração obrigatória. Segundo dados da Direcção-Geral de Alimentação e Veterinária, em 2011 foram registrados 49 casos confirmados de LA.

Os sintomas clínicos típicos de LA são o aparecimento de larvas doentes dispostas em mosaico, opérculos escurecidos, larvas de cor castanha, viscosas e com odor característico. Os restos larvares formam um fio viscoso fortemente aderido às paredes dos alvéolos e contém milhões de esporos bacterianos, que são a forma infecciosa desta estirpe (Antúnez *et al.*, 2009; Genersch *et al.*, 2006).

Um dos obstáculos ao controlo desta doença é a sua fácil propagação através de esporos, que são transportados pelas próprias abelhas durante a deriva, em materiais e equipamentos usados pelo apicultor (incluindo roupas), em cera contaminada, madeiras, pólen ou mel (Govan *et al.*, 1999; Alippi *et al.*, 2002). Todos estes fatores promovem a propagação da doença dentro de uma colmeia e entre colmeias.

Para além disso os esporos de *Paenibacillus larvae* são muito resistentes a condições ambientais adversas, como temperaturas elevadas e tratamentos químicos, permanecendo viáveis por longos períodos de tempo (pelo menos 35 anos) (Alippi *et al.*, 2002; Bastos *et al.*, 2008). A forma de erradicação de esporos mais eficiente é a incineração das colmeias, que causa elevados prejuízos económicos (Bastos *et al.*, 2008).

Uma estratégia comum de tratamento da LA é o uso de antibióticos, sendo o mais comum a oxitetraciclina (Alippi, 2000). No entanto esta estratégia, para além de não ser completamente eficaz,

também implica algumas desvantagens. O seu uso prolongado leva à existência de estirpes resistentes de *P. larvae*, que afeta a vitalidade e longevidade das abelhas adultas e das larvas. Para além disso, a contaminação do mel com resíduos químicos (Generesch *et al.*, 2006; Alippi, 2000) afeta a sua qualidade e a segurança para o consumo humano, além de impossibilitar a sua comercialização por imposição da legislação europeia (CEE n.º 2377/90).

1.1.1. Processo de infeção das larvas por *Paenibacillus larvae*

A *Paenibacillus larvae* é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbica facultativa, em forma de bastonete e formadora de esporos (Govan *et al.*, 1999, Forsgren *et al.*, 2009; Djukic *et al.*, 2014). A infeção ocorre apenas por intermédio dos esporos, que infetam larvas jovens através da ingestão de alimento contaminado. As larvas são mais suscetíveis nos estágios iniciais de vida, entre as 12 e as 36 h após a eclosão do ovo (Antúnez *et al.*, 2009; Genersch, 2010). Em 1942, Woodrow sugeriu que larvas recém-eclodidas podiam ser infetadas por apenas 10 esporos. Porém, a relação de dosagem e mortalidade é influenciada pela constituição genética, estirpes bacteriana e idade da larva (o número de esporos necessários para a infeção aumenta com o aumento da idade da larva) (Forsgren *et al.*, 2009; Genersch 2005; Yue *et al.*, 2008).

Os esporos ingeridos germinam no lúmen do intestino médio das larvas, dando origem a células vegetativas que aí proliferam, até serem capazes de romper a barreira do epitélio. Segue-se a invasão da hemolinfa e consequente disseminação da bactéria por toda a larva, provocando a sua septicemia e morte. O processo reverso, ou seja, a esporulação das células vegetativas presentes nos restos larvares, ocorre durante todo o processo de infeção (figura 1.1), e é responsável pela disseminação da doença (Yue *et al.*, 2008).

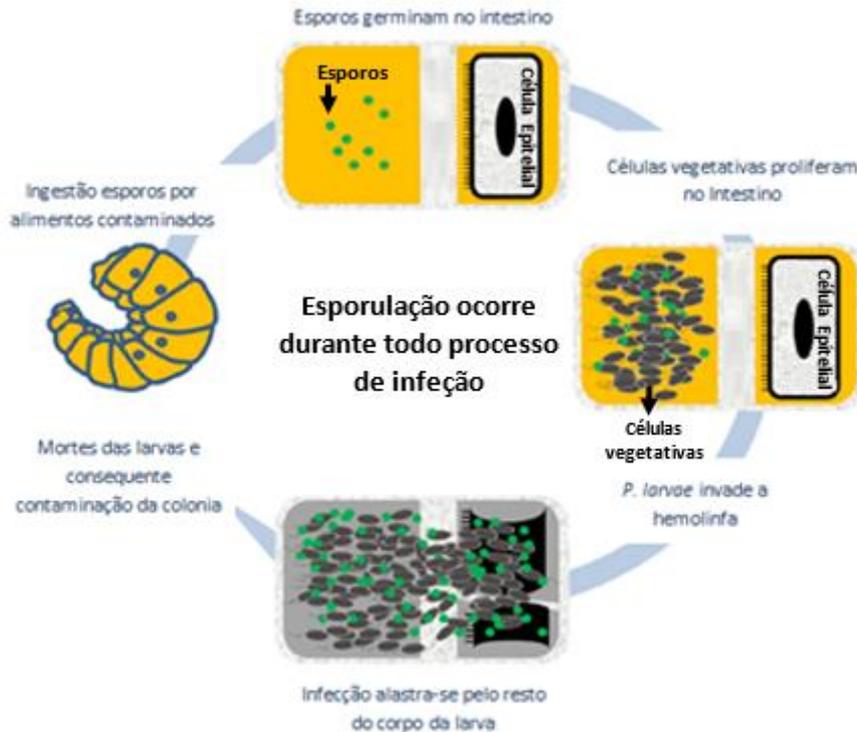


Figura 1.1. Representação esquemática do ciclo de infecção das larvas de abelhas pela estirpe *P. larvae* (adaptado de Djukic *et al.*, 2014).

Uma das características destas bactérias que lhe confere a capacidade de causar a doença é a produção de proteases extracelulares durante o crescimento vegetativo e na infecção, nomeadamente durante a proliferação no intestino da larva. Acredita-se que estas atuam como fatores de virulência ativas no processo de infecção, nomeadamente na degradação de péptidos antibacterianos e na degradação de tecidos larvares (Dancer and Chantawannakul 1997; Antunez *et al.*, 2009; Genersch, 2010). Num estudo realizado por Yue *et al.*, 2008 foi proposto que as proteases podem ser responsáveis pela rutura das barreiras epiteliais, através da degradação de proteínas que são responsáveis pela interação célula-célula e célula-matriz permitindo que as estirpes *P. larvae* invadam a hemolinfa. Para além desta função, num outro estudo (Djukic *et al.*, 2014), os autores propuseram que as proteases tinham diversas funções durante o processo de infecção, começando por degradar péptidos antimicrobianos e assim neutralizar a resposta imunitária das células epiteliais ajudando a sobrevivência da *P. larvae* no lúmen do intestino larvar. Por fim quando as larvas já estão mortas as proteases degradam os restos larvares. Antunez *et al.*, (2007) comprovou que a virulência e os padrões de proteases estão relacionados, apesar de não existir uma relação significativa entre o genótipo bacterias e os padrões de proteases.

1.1.2. Evolução da classificação da *Paenibacillus larvae*

Em 1906, o microbiologista White isolou uma bactéria a partir de uma massa viscosa que classificou com *Bacillus larvae*. Esta classificação deveu-se a capacidade das bactérias em formar endósporos, à sua forma em haste e ao facto de esta ser consistentemente encontrada em larvas mortas. Mais tarde, em 1950 Katznelson, isolou bactérias de abelhas jovens mortas reduzida a pó, que classificou como *Bacillus pulvifaciens* (Heyndrickx *et al.*, 1996; Genersch, 2009).

Resultados obtidos por Ash e colegas (1993) num estudo com base 16s ARN ribossomal mostraram que *Bacillus larvae* e *Bacillus pulvifaciens* são suficientemente distintos das outras estirpes do género *Bacillus*. Sendo estas atribuídas a um novo género *Paenibacillus*, e requalificados de *P. larvae* e *P. pulvifaciens* respetivamente (Genersch, E., 2009). A análise de várias estirpes de referência de ambas as espécies revelaram um alto grau de similaridade molecular, que levou Heyndrickx e colegas (1996) a não considerar a classificação em duas espécies. Alternativamente, e com base nas diferenças intraespecíficas nomeadamente genotípicas, fenotípicas e de patogenicidade, as espécies foram reclassificadas em duas subespécies, *Paenibacillus larvae subsp. Larvae* e *Paenibacillus larvae subsp. Pulvifaciens*.

Resultados contraditórios questionaram a validade da classificação em duas subespécies. Por exemplo, a presença de um pigmento laranja nas colónias foi descrito como sendo uma característica somente da *P. larvae subsp. Pulvifaciens*, no entanto esta característica das colónias já tinha sido isolada a partir de larvas mortas com LA (Heyndrickx *et al.*, 1996; Genersch, 2009).

Mais recentemente Genersch e colegas (2006) usaram métodos como a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), a caracterização da proteína por meio de análise de SDS-PAGE, e PCR de elementos repetitivos (rep-PCR) para confirmar as diferenças entre as duas subespécies. Os resultados obtidos confirmaram um elevado grau de semelhança entre as duas subespécies, o que foi corroborado com as semelhanças na patogenicidade, concluindo-se portanto que não havia diferenças que justificassem uma subdivisão em *P. larvae subs. Pulvifaciens* e *P. larvae subs. Larvae*. Para as diferenciar, os mesmos autores recorreram à genotipagem por rep-PCR, tendo identificado quatro genótipos diferentes dentro desta estirpe: ERIC I, ERIC II, ERIC III e ERIC IV. Os genótipos ERIC I e II correspondem à anterior subespécie *P. larvae subs. Larvae* enquanto os ERIC III e IV corresponde à anterior *P. larvae Subs. pulvifaciens* (tabela 1.1) (Genersch *et al.*, 2006).

O genótipo ERIC I tem sido isolado na europa e no continente americano enquanto ERIC II tem sido encontrado apenas na europa, já os genótipos ERIC III e IV não tem sido encontrados em grande número nos últimos anos. Estudos de virulência mostraram que as estirpes pertencentes aos genótipos ERIC II, III e IV provocam a morte de todas as larvas de colônias infetadas em apenas 7 dias, sendo por isso mais virulentas do que a ERIC I, que necessitam de 12 dias para provocar o mesmo efeito (Generesch *et al.*, 2006; Generesch, 2009; Djukic *et al.*, 2014).

Tabela 1.1. Principais características dos 4 genótipos de *P.larvae* (adaptado de Generesch *et al.*, 2009).

	<i>Paenibacillus larvae</i>			
	<i>P.L.larvae</i>	<i>P.L. pulvifaciens</i>		
Genótipos ERIC	ERICI	ERICII	ERICIII	ERICIV
Sintomas AFB	+	+	+	+
Tempo letal para todos os indivíduos expostos	~12d	~7d	~7d	~7d
Morfologia pigmentação das colônias	-	+	+	-
Hemólise	-	-	+	+
Fermentação manitol	-	+	+	+
A fermentação salicina	+	-	-	-

1.1.3. Novas estratégias de tratamento da LA

Como já referido a LA é uma doença que provoca graves perdas económicas e um decréscimo acentuado na população de abelhas. Para agravar a situação, os métodos atuais de combate à doença não são totalmente eficazes. Por esta razão, a pesquisa de formas alternativas de controlo da doença usando biocidas naturais tem-se tornado prioritário.

Nos últimos anos a pesquisa de novas alternativas de controlo tem seguido três sentidos diferentes: a seleção de abelhas resistentes à LA, o controlo biológico com bactérias que inibem a proliferação de *P. larvae*, e o tratamento com antibacterianos naturais tais como a própolis (Generesch, 2009).

A seleção de abelhas que apresentam comportamentos mais higiénicos e favorecem a remoção de larvas infetadas com *P. larvae*, para controlo da LA, tem sido usado com sucesso. No entanto para uma eficácia contínua é necessário fazer um esforço no sentido da manutenção da resistência das abelhas, seleção e melhoramento genético (Spivak, Reuter, 2001).

O controlo biológico através do uso de bactérias (por exemplo bactérias comensais) que competem e inibem a proliferação da *P. larvae* foi testado com sucesso por Evans e Armstrong, 2006, no entanto a sua eficácia e posterior utilização como tratamento da LA continua a ser alvo de estudo (Generesch, 2009).

Um dos produtos antimicrobianos naturais que têm sido testados para o controlo desta doença é a própolis, um produto resinoso extraído de plantas e transformado pelas abelhas com recurso a enzimas. É composto por uma mistura de resinas, cera, mel, óleos essenciais entre outros. Possui propriedades adesivas e é usada para revestir as paredes de favos e reconstituir fendas contribuindo para proteger a colónia contra diferentes patogénicos, devido às suas propriedades antimicrobianas, antivirais, antioxidantes, anti-inflamatórias, etc. (Sforcin, 2007; Antunez *et al.*, 2008). A sua atividade pode estar relacionada com a composição química que inclui compostos fenólicos, terpenos (metabolitos naturais origem vegetal), óleos essenciais entre outros (Sforcin, 2007). Estudos concluíram que o uso da própolis como terapia para esta doença é uma alternativa eficaz e segura para as abelhas, podendo inibir a replicação e crescimento das células vegetativas no intestino da larva, no entanto são necessários mais testes para comprovar os resultados obtidos (Antunez *et al.*, 2008; Bastos *et al.*, 2008).

Também o efeito de óleos essenciais foi avaliado no controlo da LA. Estes compostos, que são utilizados e conhecidos por inibir o crescimento de bactérias, leveduras, bolores, que derivam de extratos de plantas, mostraram uma inibição significativa do crescimento de *P.larvae* e ausência de toxicidade para as abelhas. Contudo novos estudos são necessários para perceber quais os compostos com atividade biológica mas também para testar a sua toxicidade (González, Marioli, 2010).

1.2. Bacteriófagos

Bacteriófagos (fagos) são vírus que infetam exclusivamente bactérias, afetando o seu metabolismo e provocando a sua lise. São ubíquos na natureza, podendo ser encontrados nos ambientes onde a bactéria prevalece, e colonizam animais, incluindo os seres humanos. São considerados como os agentes biológicos mais abundantes, estimados em cerca de 10^{31} , e estão amplamente distribuídos na biosfera (Grabow, 2001, Rohwer and Edwards, 2002; Jończyk *et al.*, 2011). Os fagos foram descobertos experimentalmente em 1915 por Twort e D'Herelle, embora só tenham sido relatados em 1896 (Grabow, 2001).

A sua estrutura morfológica é constituída normalmente por uma cápside, proteica ou lipoproteica, que contém uma cadeia dupla ou simples de ADN (ácido desoxirribonucleico) ou ARN (ácido ribonucleico). Na sua grande maioria (cerca de 95 %) possuem uma cauda, responsável pela passagem do material genético para a célula hospedeira durante a infeção, que termina em fibras caudais, estruturas que se ligam a recetores específicos da superfície bacteriana, para ocorrer a adesão do fago ao hospedeiro (Figura 1.2) (Gravow 2001; Deresinski de 2009; Jończyk *et al.*, 2011).

Desde que foram descobertos, a classificação dos fagos foi sofrendo grandes alterações na sua identificação, em grande parte devido aos avanços científicos. Estes são agrupados segundo características comuns nomeadamente: morfologia, tipo de ácido nucleico, tamanho do genoma, gama de hospedeiros, entre outros (Nelson, 2004; Matsuzaki *et al.*, 2005). Dos fagos reportados na literatura, cerca de 96 % são fagos com cauda (*Caudovirales*) e constituídos por ADN de cadeia dupla. Estes, de acordo com as características morfológicas da cauda são divididos em três famílias: *Myoviridae* que possui uma cauda longa e contráctil, *Siphoviridae* com cauda longa, mas não-contráctil e *Podoviridae* fago com cauda curta (Matsuzaki *et al.*, 2005).

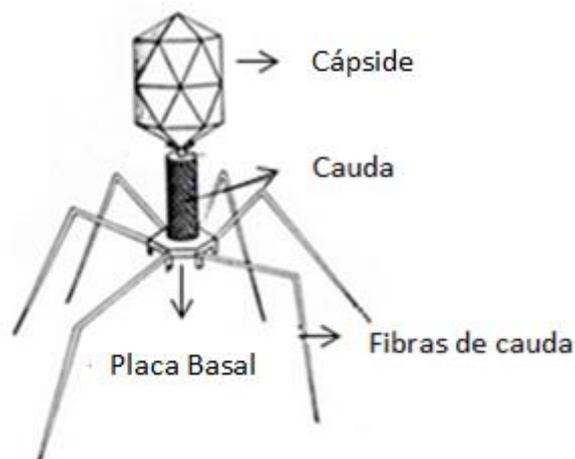


Figura 1. 2. Estrutura morfológica de um fago tipo T4 (adaptado de Todar *et al*/2012).

1.2.1. Ciclo de Vida

Os fagos reconhecem e ligam-se a recetores específicos na parede das células bacterianas, introduzindo o seu próprio material genético, e beneficiando da maquinaria bioquímica do hospedeiro para produzir novos fagos (Muyombwe *et al.*, 1999, Sulakvelidze *et al.*, 2001).

O ciclo de infeção de um bacteriófago inicia-se com a adsorção do fago às bactérias, através do contato entre as suas fibras e recetores localizados na parede celular bacteriana, geralmente uma proteína ou um lipopolissacarídeo. Após este processo o material genético do fago é injetado para o citoplasma bacteriano, onde será posteriormente transcrito em proteínas que irão fazer parte dos novos fagos (Matsuzaki *et al.*, 2005). Dá-se assim início a um de dois possíveis ciclos de vida diferentes: o ciclo lítico ou o ciclo lisogénico (Figura 1.3). Se o fago segue exclusivamente o ciclo lítico é então classificado como virulento, e se por outro lado, é capaz de permanecer no estado latente, integrado no genoma do hospedeiro, segue o ciclo lisogénico e é classificado como temperado (Deresinski, 2009).

O ciclo lítico é caracterizado pela rápida lise e destruição das bactérias, após a replicação do fago no seu interior e a libertação dos novos fagos com potencialidade para infetarem novas bactérias (Kropinski, 2006; Matsuzaki *et al.*, 2005). Para a libertação das novas partículas virais, são necessárias duas proteínas codificadas pelo genoma do fago, as holinas e as endolisinas ou lisinas. Holinas são proteínas hidrofóbicas que formam poros na membrana da célula permitindo o acesso das lisinas ao peptidoglicano, degradando-o e consequentemente provocando a lise celular com libertação de dezenas de novos fagos. Estima-se que cerca de 10 a 100 novos fagos sejam libertadas no final de um ciclo de vida, que estarão disponíveis para infetar novas bactérias (Kropinski, 2006, Deresinski, 2009).

No ciclo lisogénico, os fagos temperados codificam enzimas que permitem a integração do seu material genético no genoma do hospedeiro, e aí permanecem como profagos. Este tipo de fagos replica-se juntamente com o cromossoma bacteriano, garantindo assim a sua descendência, sem provocar a lise bacteriana. No entanto através de estímulos ambientais e sob condições de stresse bacteriano, (como agressões no ADN, exposição à luz UV ou produtos químicos), o profago pode iniciar um ciclo lítico e causar a lise bacteriana (Matsuzaki *et al.*, 2005; Deresinski, 2009; Endersen *et al.*, 2014). Em certos casos, estes fagos temperados podem transportar consigo genes indesejáveis originários do genoma das bactérias, e transferi-los para outras bactérias em infeções

seguintes, podendo, em alguns casos potencializar a virulência dessas mesmas bactérias segundo um fenômeno descrito como “conversão lisogênica”. Por essa razão, e porque normalmente não lizam a totalidade das bactérias que infetam, os fagos temperados, não são indicados para utilização em terapia (Kropinski, 2006).

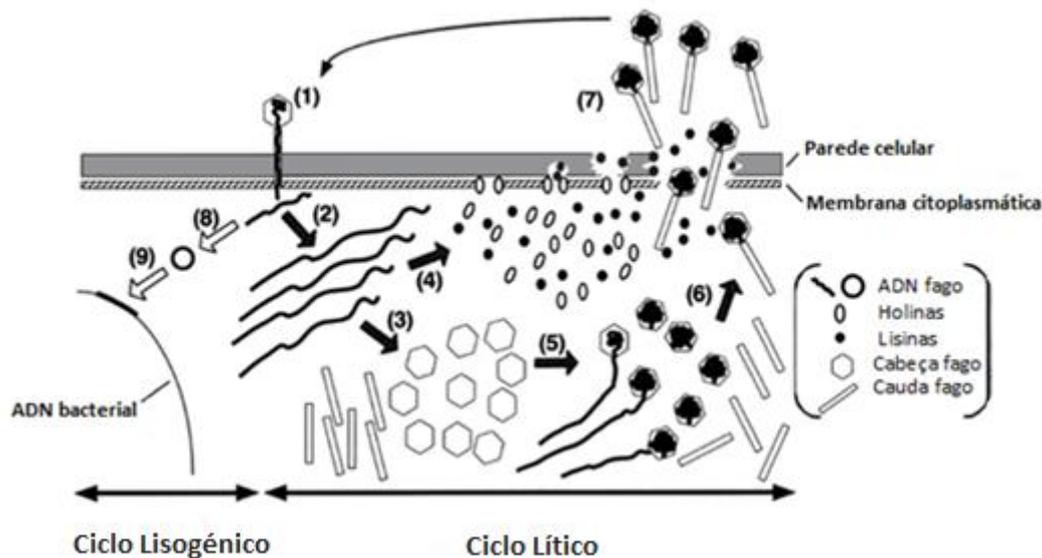


Figura 1.3. Descrição esquemática do ciclo lítico e lisogênico: (1) Adsorção e injeção do ADN do fago; (2) replicação de ADN; (3) produção da cauda e cabeça; (4) síntese de holinas e lisinas; (5) Empacotamento do ADN; (6) conclusão do fago; (7) rompimento da parede celular e a liberação de novos fagos; (8) circularização ADN de fagos; (9) a integração do ADN do fago no genoma do hospedeiro (adaptado de Matsuzaki *et al.*, 2005).

A destruição bacteriana que ocorre no final do ciclo lítico faz com que os fagos sejam considerados agentes antimicrobianos, fato que tem vindo a ser comprovado com estudos do seu potencial como agentes terapêuticos (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

1.2.2. Importância e aplicação dos fagos

O uso de fagos como agentes terapêuticos de infecções bacterianas é usado desde 1919, ano em que Felix D'Herelle tratou uma criança de 12 anos com disenteria bacteriana (Síndrome de Marlow). Após o período de entusiasmo devido ao sucesso por parte de D' Herelle, seguiu-se uma época em que diversos antibióticos foram desenvolvidos e comercializados. Consequentemente, a terapia fágica ficou um pouco esquecida nos países a Ocidente (Sulakvelidze *et al.*, 2001; Chan *et al.*,

2013). Mais recentemente, devido ao aparecimento de bactérias resistentes a antibióticos, o interesse no uso de bacteriófagos como agente antimicrobianos é novamente considerado (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

Os fagos apresentam muitas vantagens como agentes antimicrobianos, especialmente em relação ao uso de antibióticos. O isolamento de novos fagos é relativamente rápido quando comparado com a descoberta de novas moléculas de antibióticos; são muito específicos, afetando somente as bactérias alvo no local da infecção, não prejudicando a microflora natural; são seguros não sendo até ao momento descritos efeitos secundários do uso de fagos; são eficazes contra bactérias multirresistentes; podem responder rapidamente ao aparecimento de hospedeiros mutantes resistentes aos fagos, porque são também capazes de sofrer mutações; mantêm a sua ação em condições ambientais adversas; permitem a distinção entre células bacterianas vivas e mortas (Sulakvelidze *et al.*, 2001; Matsuzaki *et al.*, 2005; Housby and Mann 2009; Schmelcher and Loessner, 2014). Os fagos podem ainda ser utilizados em combinações de vários fagos diferentes, de forma a aumentar o espetro de ação (Endersen *et al.*, 2014).

Assim fagos e moléculas sintetizadas durante o seu ciclo de infeção começaram a ser usados e investigados por parte de algumas empresas em várias áreas. Por exemplo, em veterinária, os fagos têm sido utilizados para o controlo de infeções em animais, como as provocadas por *Salmonella* e *Campylobacter* em aves de capoeira. A empresa Intralytix comercializa produtos à base de bacteriófagos para cuidados de saúde animal eficazes contra *Salmonella* (PLSV-1™) e *Clostridium perfringens* (INT-401™) (<http://www.intralytix.com/>; Endersen *et al.*, 2014). Na agricultura, os fagos têm sido usados para controlar bactérias nocivas para o tomate e pimento, como por exemplo o produto Agriphage desenvolvido pela OmniLytics (Endersen *et al.*, 2014).

Numa outra perspetiva, vários estudos revelaram que o uso de fagos como biossensores por exemplo na indústria alimentar pode ser uma ferramenta bastantes útil e rápida de diagnóstico usando por exemplo marcadores fluorescentes (Endersen *et al.*, 2014; Hodyra and Dabrowska, 2014). Para além disso na indústria alimentar os fagos são utilizados para controlar bactérias como a *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Campylobacter* e *Escherichia coli*. Por exemplo, a Intralytix desenvolveu produtos à base de bacteriófagos como é o caso ListShield™ para reduzir ou eliminar os riscos de contaminação com *Listeria monocytogenes*, o EcoShield™, eficaz contra a *E. coli* e o SalmoFresh™ para controlar a *Salmonella* spp (<http://www.intralytix.com/>; Endersen *et al.*, 2014).

Em medicina Humana, o uso de fagos imobilizados em membranas como é o caso do PhagoBioDerm do PyoPhage, BioPharm-L, com grande variedade de ação em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, tem sido usado com sucesso (70 %) no tratamento de úlceras e infecções recorrentes em vítimas de queimaduras. Mais tarde foi desenvolvido um outro produto em que fagos imobilizados em tiras de nylon se mostraram eficazes contra espécies *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (Kropinski 2006).

Relativamente aos fagos de *Paenibacillus larvae* descritos na literatura, existem seis, que foram isolados e sequenciados. O fago philBB_PI23, *Siphoviridae*, foi isolado de uma cultura de *P. larvae*, obtida a partir de larvas das abelhas de uma colmeia Portuguesa (Oliveira *et al.*, 2013a). Todos os outros cinco fagos pertencem a família *Myoviridae*, dos quais dois foram isolados a partir de amostras de solo e os outros três de amostras de larvas recolhidas em Utah, EUA (Shelfo *et al.*, 2013).

1.3. Endolisinas

O peptidoglicano (PG) é um componente essencial e estrutural na parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, funcionando como uma barreira de proteção, pois confere resistência mecânica à pressão osmótica, mantém o tamanho e forma específica da célula, e permite interações específicas com o meio ambiente (Verheust *et al.* De 2004; Nelson *et al.*, 2012). As hidrolases do PG são enzimas líticas que atuam sobre o PG e podem ser classificadas por autolisinas e exolisinas.

As endolisinas são produzidas pelos fagos no final do seu ciclo de infeção. Estas enzimas muralíticas, como também são conhecidas, causam lise das bactérias, porque atuam ao nível do peptidoglicano comprometendo a sua resistência mecânica, necessária para suportar a pressão citoplasmática interna. Consequentemente ocorre a degradação da camada rígida de mureína, possibilitando a libertação de fagos (Loessener *et al.*, 2005; Obeso *et al.*, 2008;). Para este processo ocorrer é ainda necessária a ação prévia de outras enzimas, as holinas. São pequenas proteínas hidrofóbicas codificadas a partir do genoma dos fagos, que formam poros na membrana da célula, e permitem que as endolisinas alcancem o peptidoglicano (figura 1.4) (Loessner 2005; Fischetti *et al.*, 2008; Nelson *et al.*, 2012).

Estas endolisinas são particularmente eficazes quando aplicadas de forma exógena em bactérias Gram-positivas, uma vez que o peptidoglicano se encontra exposto e disponível para a sua ação.

Neste caso, a ação em células gram-positivas é facilitada em relação às gram-negativas uma vez que estas não possuem membrana celular externa, e o PG está disponível para a enzima, não necessitando da ação das holinas (figura 1.4) (Loessner,2005). Ao contrário, as bactérias gram-negativas possuem uma estrutura mais complexa em que o peptidoglicano está contido dentro do espaço periplasmático entre as membranas bacterianas interiores e exteriores. A membrana externa destas bactérias é impermeável e a forma de possibilitar o acesso da endolisina ao PG a partir do exterior da célula é através de permeabilizantes, tais como EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), ácido cítrico, ácido málico (Figura 1.6) (Oliveira *et al.*, 2014).

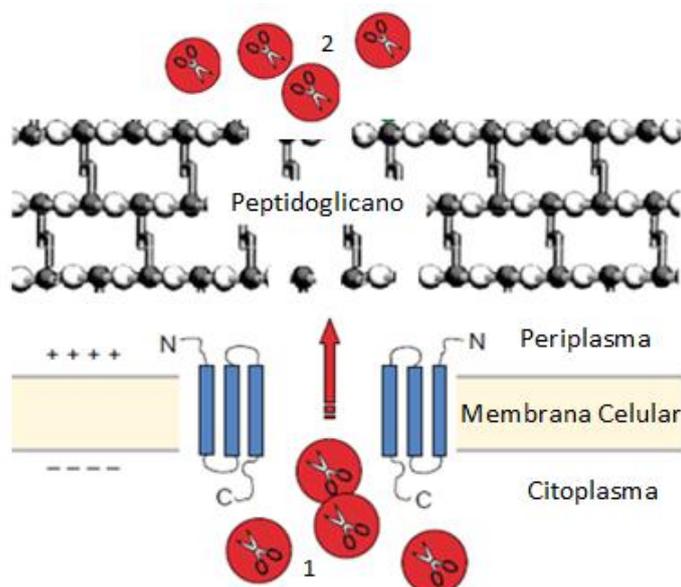


Figura 1.4. Representação esquemática da atuação das endolisinas na célula bacteriana. Holinas (a azul) inserem-se na membrana citoplasmática formando poros. As endolisinas (a vermelho) passam por esses poros para aceder ao peptidoglicano, provocando lise das células 1- atuação endógena dentro para fora; 2- atuação exógena em células gram-positivas (adaptado de Loessner *et al.*, 2005).

1.3.1. Estrutura, função e modo de ação das endolisinas.

As endolisinas, de bactérias gram-positivas apresentam uma estrutura modular composta por pelo menos dois domínios funcionais claramente separados por uma região de ligação, o domínio N-terminal e o domínio C-terminal (figura 1.5). Região N-terminal geralmente corresponde ao domínio catalítico, que contém a atividade enzimática. Já a região C-terminal normalmente corresponde ao domínio de ligação à parede celular (CBDs) da bactéria. O CBD liga-se a um substrato específico, normalmente um hidrato de carbono da parede celular da bactéria, sendo por isso responsável pela especificidade da endolisina. Um estudo de comparação de sequências entre

enzimas da mesma classe revelou que o domínio catalítico é a região mais conservada, enquanto a região C-terminal a mais variável (Loessner, 2005; Fischetti *et al.*, 2008).



Figura 1.5. Representação esquemática do domínio catalítico (na região N-terminal) e do domínio de ligação à parede celular (na região C-terminal) (adaptado de Fischetti *et al.*, 2008).

Dependendo de sua atividade catalítica, as endolisinas são divididas em grupos distintos: amidases, glicosidases, endopeptidases e transglicosidases (figura 1.6).

Por exemplo, as N-acetilglucosaminidases, um tipo de glicosidases, atuam sobre a ligação glicosídica que liga os açúcares na parede celular, reduzindo o glicano a N-acetilglucosamina (GlcNAc); um outro tipo de glicosidases, as N-acetil- β -d-muramidases (muitas vezes chamadas lisozimas ou muramidases) clivam o glicano do PG em Ácido N-acetilmurâmico (MurNAc). As amidases, como é o caso da N-acetylmuramoyl-L-alanina, clivam a ligação entre o glicano (MurNAc) e a porção de peptido (L-alanina). Por seu lado as endopeptidases agem sobre ligações peptídicas entre dois aminoácidos. Por fim, as transglicosidase têm um modo de ação muito semelhantes às glicosidases, mas formam um resíduo de N-acetyl-1,6-anhydro-muramyl durante a clivagem glicosídica. (Loessner *et al.*, 1997; Nelson *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2012).

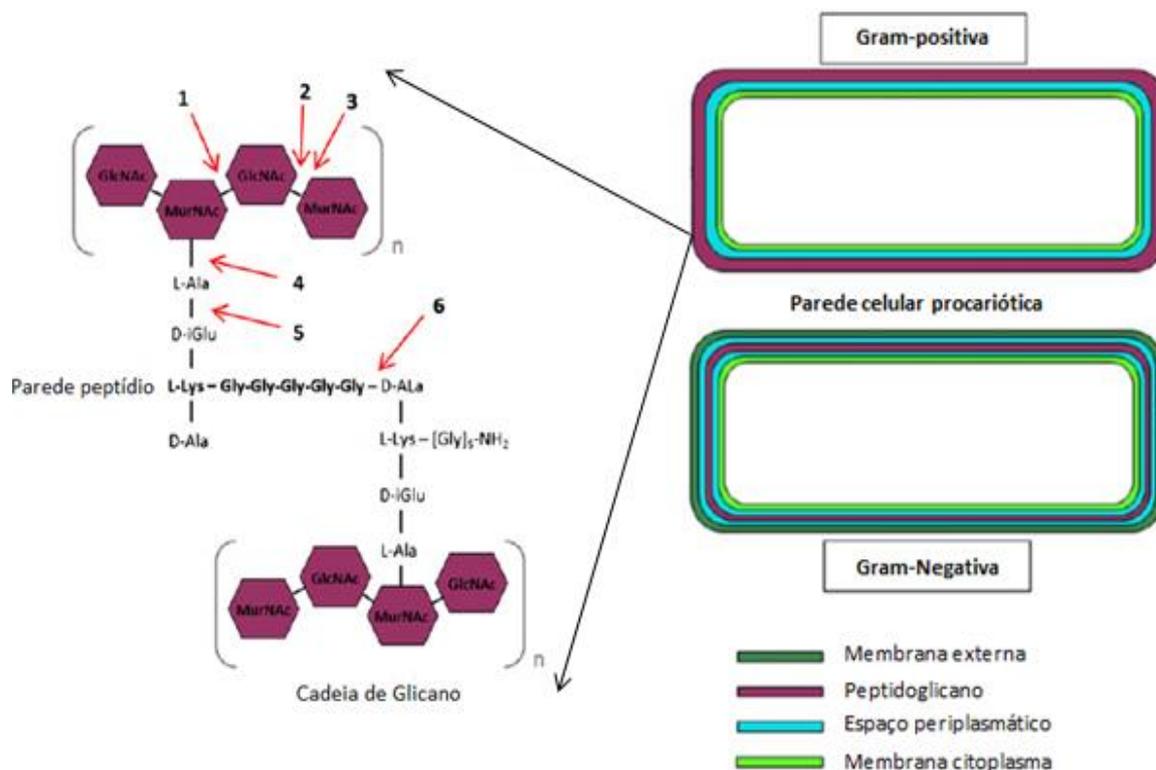


Figura 1.6. Representação esquemática da estrutura bacteriana das células gram-positivas e gram-negativas. Ação da endolisina sobre o peptidoglicano em bactérias gram-positivas: 1) N-acetil-b-D-glucosaminidase; 2) N-acetil-b-D-muramidase; 3) transglicosilase lítica; 4) N-acetylmuramoyl-L-alanina-amidase; 5) a endopeptidase-L-glutamato alanoyl-D; 6) endopeptidase D-alanil-glicil; 7) endopeptidase D-alanina-D-meso DAP e 8) D-glutamil-m-DAP endopeptidase (adaptado Oliveira *et al.*, 2012).

Em geral, as endolisinas só atuam sobre espécies (ou subespécies) de bactérias a partir das quais foram produzidas (Fischetti *et al.*, 2008; Fischetti, 2010). Possuem várias características que as tornam um potencial agente antimicrobiano. São ativas contra bactérias, independentemente de seu padrão de sensibilidade aos antibióticos, possuem baixa probabilidade de desenvolvimento de resistência bacteriana, a atividade lítica é específica, sem afetar outras bactérias, e ainda têm demonstrado uma elevada atividade enzimática que permite a lise de células bacterianas muito rapidamente (em minutos ou mesmo segundos) (Obeso *et al.*, 2008; Son e al., 2012).

1.3.2. Aplicações terapêuticas

Assim como os fagos, o uso endolisinas tem sido considerado uma boa alternativa aos antibióticos, especialmente em bactérias gram-positivas, que como já foi mencionado, funcionam de forma exógena, e possuem uma elevada especificidade para um hospedeiro. Além disso, uma pequena quantidade de enzima recombinante purificada é suficiente para destruir rapidamente a bactéria (Loessner, 2005).

Devidas as suas características, o uso das endolisinas tem sido avaliado em áreas diferentes, como em medicina, com modelos animais, na biotecnologia e nas ciências dos alimentos.

No setor alimentar, a aplicação de endolisinas têm sido testada com sucesso em produtos tais como leite e sumo de banana, para evitar a contaminação de *Staphylococcus aureus* ou de bactérias Gram-negativas (Son *et al.*, 2012). Resultados promissores foram também obtidos no queijo para controlo da *Listeria monocytogenes* (Schmelcher, *et al* 2011).

No que respeita as aplicações médicas o uso de endolisinas tem sido testado em modelos animais, para o controlo de doenças em humanos, de forma isolada ou em combinação com antibióticos. Os primeiros estudos realizados com sucesso foram em ratos, em que adição de endolisina PlyC à cavidade oral de ratos, seguido de uma infeção por *Streptococcus* (10^7 CFU/ml) proporciona uma proteção contra a colonização (28.5 % infetados) em comparação com controlos sem endolisina (70.5 % infetados) (Nelson *et al.*, 2001). Num estudo de Cheng *et al.*, (2005) uma outra endolisina PlyGBS foi testada no modelo vaginal de ratos como agente terapêutico para prevenir a transmissão de *Streptococcus agalactiae* de mulher grávidas para os seus fetos. Uma única dose de endolisina diminui aproximadamente a colonização de bactéria em 3 log, e para além disso não demonstrou atividade contra bactérias comensais (Shen *et al.*, 2012). Também as endolisinas de *Bacillus*, PlyG e PlyPH mostraram proteção contra os patogénicos em ratos, em que o uso destas enzimas prolongou o tempo de vida dos ratos em comparação com animais que não receberam tratamento (Shen *et al.*, 2012).

Resultados semelhantes foram obtidos também em modelos de ratos, com o uso das endolisinas MV-L e ClyS contra infeções de *Staphylococcus aureus*, e ainda Cpl-1 e PAL mostraram atividade antimicrobiana sobre *Streptococcus pneumoniae* (Shen *et al.*, 2012).

O uso de endolisinas em animais também foi testado em bovinos, tendo-se comprovado a eficácia das endolisinas em eliminar infeções das glândulas mamárias (Obeso *et al.*, 2008).

Numa perspetiva mais geral, a sua eficácia antimicrobiana foi ainda comprovada em outras estirpes como *Bacillus anthracis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* entre outras (Schmelcher, *et al*/2011; Son *et al.*, 2012).

Todos estes resultados demonstram o potencial das endolisina como agente terapêutico para as mais diversas infeções bacterianas. De tal modo, com este trabalho pretende-se testar o potencial terapêutico de uma endolisina isolada do fago philBB_PI23 (Oliveira *et al.*, 2010) sobre a doença LA provocada pela bactéria *Paenibacillus larvae*, que afeta os estágios larvares das abelhas *Apis mellifera*.

Materiais e Métodos

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Isolamento caracterização de estirpes de *Paenibacillus larvae*

2.1.1. Isolamento de estirpes de *P. larvae*

O isolamento de estirpes de bactéria de *Paenibacillus larvae* foi realizado a partir de material recolhido de colmeias do norte de Portugal, que exibiam sintomas clínicos da loque americana, nomeadamente: mel, cera e larvas mortas. As amostras foram sujeitas a um pré-tratamento, de acordo com a sua matriz: i) as larvas mortas foram recolhidas com uma zaragatoa a partir dos favos, que posteriormente foi imersa em 5 ml de tampão fosfato-salino (PBS (*phosphate buffered saline*)), (Forsgren *et al.*, 2008); ii) o mel foi diluído (1:1 (m/v)) em PBS (20 g de mel em 20 ml de PBS), centrifugado (40 min a 6 000 xg (Sigma 3-16K centrifuge)) e ressuspensão novamente em PBS (1 ml) (Graaf *et al.*, 2013); iii) as amostras de cera foram dissolvidas em tolueno (9 ml) e água (2 ml) para obter uma fase aquosa que foi posteriormente recuperada (Ryba *et al.*, 2009). As suspensões resultantes do processamento de cada amostra foram aquecidas a 90 °C por 15 min de forma a ativar os esporos presentes, induzindo a sua germinação, e eliminando outros microrganismos presentes, diminuindo o risco de resultados falsos positivos (Bakonyi *et al.*, 2003, Forsgren *et al.*, 2009). Posteriormente, as suspensões foram cultivadas em meio MYPGP agar (10 g/L de Muelle-Hinton Broth, 15 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de K₂HPO₄, 1 g/L de Na-piruvato 2 % glucose e 20 g/L de agar), e incubadas a 37 °C com 5 % de CO₂ durante 6 dias (Graaf *et al.*, 2013). As colónias resultantes da incubação foram suspensas em meio de cultura MYPGP (10 g/L de Mueller-Hinton Broth, 15 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de K₂HPO₄, 1 g/L de Na-piruvato 2 % glucose) suplementado com 15 % de glicerol, e criopreservadas a -80 °C para posteriores utilizações.

2.1.2. Identificação das estirpes de *P. larvae* 16s PCR

A diferenciação entre a espécie *P. larvae* e outras espécies bacterianas formadoras de esporos que tivessem sido isoladas das amostras ambientais foi realizada por PCR, utilizando *primers* (Tabela 2.1.) que amplificam um fragmento de 1106 bp do gene de ARN ribossomal 16S (GenBank X60619).

Tabela 2.2 *Primers* usados para a identificação e genotipagem de estirpes *P. larvae* por PCR.

Nome	Sequência	Tamanho produto PCR	Aplicação	Referência
AFB-F AFB-R	5'-CTTGTGTTTCTTTTCGGGAGACGCCA-3' 5'-TCTTAGAGTGCCACCTCTGCG-3'	1106 bp	Identificação das Estirpes <i>P. larvae</i> 16S PCR	Dobbelaere et al., 2001
ERIC1R ERIC2	5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3' 5'-AAGTAAGTACTGGGGTGAGCG-3'	Vários Tamanhos	Genotipagem das estirpes <i>P. larvae</i>	Versalovic et al., 1994

As sequências de *primers* utilizadas foram AFB-F e AFB-R (Tabela 2.1.) (Dobbelaere *et al.*, 2001). Inicialmente procedeu-se à purificação do ADN bacteriano de todas as estirpes, através de um kit comercial, o GRS Viral DNA/RNA Purification Kit (Grisp), usado de acordo com as instruções do fabricante.

A concentração do ADN foi obtida através da medição da absorvância a 260 nm utilizando um espectrofotômetro de DU-600 Nanodrop Technologies (Beckman, Fullerton, CA). As reações de PCR foram realizadas num volume total de 25 µl, utilizando 12.5 µl de HotStarTaq Master Mix (QIAGEN), 1 µl de cada *primer* e 3 µl de ADN. A reação foi processada num termociclador (Bio RAD MJ mini Personal Thermal Cycler) com um passo de desnaturação inicial a 95 °C durante 15 min, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 1 min, emparelhamento a 55 °C durante 30 s, a extensão 72 °C durante 1 min 30 s, e uma extensão final a 72 °C durante 5 min.

Uma amostra de 10 µl do PCR foi analisada num gel de 0.8 % agarose com 1x TAE (Tris-Acetato EDTA (40 mM Tris-HCl pH 7.2 500 mM acetato de sódio e 50 mM EDTA)), corado com SYBR Safe (Nzytech), após corrida a 100 volts. As bandas de ADN foram visualizadas através de luz UV (Gel DocTM XR+ Imager, Bio Rad).

2.1.3. Genotipagem das estirpes de *P. larvae*

A genotipagem das estirpes de *P. larvae* foi realizada por rep-PCR, que consiste na amplificação de sequências de ADN, utilizando *primers* aleatórios de baixo peso molecular. A finalidade é obter um perfil de bandas de ADN (fingerprinting) que vão diferenciar cada genótipo (Govan *et al.*, 1999, Graaf *et al.*, 2013), neste caso, ERIC I, II, III e IV. Os genótipos ERIC I e II correspondem à subespécie *P. larvae* subsp. *larvae* e os genótipos ERIC III e IV corresponde à subespécie *P. larvae* subsp. *pulvificiens* (Genersch, 2010).

As sequências de *primers* usadas foram ERIC1R e ERIC2 (Tabela 2.1). A reação de PCR foi realizada num volume final de 25 µl, com tampão reação 1x (suplementado com 1.5 mM de MgCl₂), 0.3 U da polimerase KapaTaq (KAPA Biosystems), 250 µM dNTP's, 0.5 mM de cada *primer* e 2 µl de

amostra de ADN (obtido como descrito em 2.1.2). O termociclador (BioRad MJ mini Personal Thermal Cycler) foi programado com um passo de desnaturação inicial a 95 °C durante 15 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 45 s, emparelhamento a 47 °C durante 45 s, extensão a 72 °C durante 2 min, e uma extensão final a 72 °C durante 10 min. Uma amostra de 10 µl do produto de PCR foi analisada num gel de 0.8 % agarose com 1x TAE (Tris-Acetato EDTA), corado com SYBR Safe (Nzytech), após corrida a 50 volts. As bandas de ADN foram visualizadas através de luz UV (Gel DocTM XR+ Imager, Bio Rad).

2.2. Seleção de Bacteriófagos

2.2.1. Isolamento de bacteriófagos

Inicialmente foram recolhidas amostras de solo e efluente das redondezas de apiários da zona norte de Portugal. Dois métodos diferentes foram usados de forma a conseguir o isolamento de novos bacteriófagos (fagos) para *P. larvae*. A co-cultura das amostras em meio líquido e a incorporação das amostras com cada estirpe bacteriana, em meio sólido.

Em seguida descreve-se o procedimento de isolamento em meio líquido, que foi usado tanto para as amostras de solo como para as de efluente.

Para as amostras de efluente, um volume de 250 ml foi misturado com 250 ml de MYPGP (concentrado 2x), e inoculado com cinco estirpes de *P. larvae* (escolhidas de forma aleatória). A incubação ocorreu a 37 °C, 120 rpm (Environmental Shaker incubater ES- 20/60), *overnight*. No caso das amostras de solo, foi utilizado um método adaptado de Williamson *et al.* (2003), que tem em conta que os bacteriófagos poderão estar aderidos às partículas de solo devido a interações iónicas (cargas opostas), e portanto considera que a quebra destas forças pode ser importante no isolamento de novos bacteriófagos. Assim, a amostra de solo (1/3 (p/v)) foi previamente suspensa em 250 ml de tampão SM (NaCl, MgSO₄·7H₂O, Tris HCl 1M pH 7.5 e H₂O (*SM Buffer*)) com 10 % de extrato de carne (50 g/L), e incubada a 4 °C por 3 horas. Posteriormente adicionou-se 250 ml de MYPGP (concentrado 2x) juntamente com 5 estirpes de *P. larvae* (escolhidas de forma aleatória) e incubou-se a 37 °C, 120 rpm (Environmental Shaker incubater ES- 20/60), *overnight*. Após a incubação, as amostras foram sujeitas a ultrassons: 1 ciclo 30 s com 40 % de amplitude (cole parner ultrasonic processor).

Após o processamento das amostras de solo e de efluente como descrito, as amostras foram centrifugadas 6 654 xg por 20 min a 4 °C (Sigma 3-16K centrifuge) e filtradas através de filtros de

PES (Membrana De Polietersulfona) de 0,22 μm (Whatman). Para avaliar o potencial antimicrobiano dos filtrados, um volume de 10 μl foi dispensado sobre *lawns* bacterianos das estirpes de *P. larvae* usadas na co-cultura para o isolamento de fagos: 100 μl de cada estirpe foram inoculados em 3 ml de 0.5 % MYPGP agar (fundido e arrefecido até cerca de 45 °C), e posteriormente vertidos para uma placa de MYPGP agar. As placas foram incubadas a 37 °C, 5 % CO₂, *overnight*. No dia seguinte verificou-se, se existiam ou não zonas de lise indicativas da presença de fago.

Foi ainda testado um método de isolamento em meio sólido, neste caso apenas com as amostras de solo. Numa placa de MYPGP agar colocou-se 100 μl de uma suspensão de cada bactéria selecionada para o isolamento de fagos, em tampão SM juntamente com cerca de 20 g de solo, adicionou-se meio MYPGP com 0.4 % de agarose e incubou-se as amostras *overnight* a 37 °C (Serwer et al 2004). No dia seguinte juntou-se 5 ml de tampão SM às amostras e incubou-se a 4 °C por no mínimo 3 horas. Após remoção do tampão, adicionou-se ¼ de volume de clorofórmio e centrifugou-se a 8000 xg por 10 min. Recuperou-se a fase superior com o auxílio de uma pipeta. Para verificar a presença de fago realizou-se o teste de inibição bacteriana, dispensando 10 μl da suspensão obtida em *lawns* de cada uma das estirpes bacteriana selecionadas para o isolamento, como já descrito em cima.

2.2.2. PhilBB_PI23

2.2.2.1. Produção

O fago philBB_PI23 pertencente à coleção do CEB (Centro Engenharia Biológica) foi isolado a partir de uma estirpe de *P. larvae*, especificamente a H23 (Oliveira *et al*, 2013). Para a produção deste fago, semeou-se a sua bactéria hospedeira H23 em MYPGP agar, e depois da incubação a 37 °C, 5 % CO₂ *overnight*, esta foi suspensa em tampão SM. À suspensão de hospedeiro (D.O_{620nm} 0.7-0.8) adicionou-se a suspensão do fago (10⁶ PFU.mL⁻¹), incubou-se a mistura à temperatura ambiente cerca de 20 min, e de seguida adicionou-se meio MYPGP 0.1 % agar fundido e arrefecido (por placa, 2.5 μl fago: 2.5 μl hospedeiro: 5 ml MYPGP 0.1 %).

Após verter a mistura em placas de MYPGP agar, estas foram incubadas a 37 °C com 5 % CO₂ *overnight*. No dia seguinte, a cada placa adicionou-se 1ml de tampão SM e foram incubadas a 4 °C durante 2 horas. O agar juntamente com o tampão foi raspado com o auxílio de um espalhador, e recolhido para tubos de 50 ml. Posteriormente foi centrifugado por 10 min a 6 654 xg a 4 °C. Recolheu-se o sobrenadante e o fago produzido foi filtrado através de acrodiscos de PES de 0.22 μm

(Whatman) e armazenado a 4 °C. A concentração de fago em PFU.ml⁻¹ foi medida através do método das diluições sucessivas, como descrito por Adams (1959). Resumidamente colou-se 100 µl de fago para 900 µl de tampão SM (diluição -1) posteriormente retirou-se 100 µl desta mistura e suspendeu-se em 900 µl de tampão SM, e assim sucessivamente. A 100 µl de cada diluição de fago adicionou-se 100 µl de suspensão da estirpe H23 em tampão SM. Por fim adicionou-se 3 ml de meio MYPGP 0.5 % agar, verteu-se a mistura sobre placas de MYPGP agar, que foram incubadas *overnight* a 37 °C com 5 % CO₂. No dia seguinte contou-se o número de placas fágicas (Figura A3.1. Anexo III) que eram visíveis, na diluição que continha entre <30, >300, e multiplicou-se esse número pelo respectivo fator de diluição para obter a concentração final.

2.2.2.2. Espetro lítico

O espectro lítico do fago philBB_PI23 foi realizado através do teste do halo de inibição bacteriana. Todas as estirpes isoladas identificadas como *P. larvae* foram incubadas *overnight* em MYPGP (37 °C, 5 % CO₂) e suspensas em tampão SM. Um volume de 100 µl de cada suspensão bacteriana foi inoculado em 3 ml de meio MYPGP 0.5 %. O resultante foi vertido em placas de MYPGP agar. Após solidificar, colocou-se uma gota de 10 µl de suspensão de fago, deixou-se secar e incubou-se as placas a 37 °C com 5 % CO₂, *overnight*. As estirpes foram consideradas sensíveis ao fago sempre que se visualizou um halo de inibição bacteriana no local onde se depositou o fago.

O estudo do espectro lítico foi ainda realizado noutras espécies Gram-positivas nomeadamente: *Bacillus Cereus*, *Bacillus subtilis subsp subtilis*, *B.thuringiensis*, *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus Lactis* e *Lactobacillus paracasei*. Pertencendo ao mesmo grupo de peptidoglicano que *P. larvae* grupo A, especificamente ao grupo A1 para o género *Bacillus*, e grupo A4 para o género *Lactobacillus* (Scheleifer e Kandler, 1972).

O inóculo de células de *Bacillus* foi feito a partir de uma única colónia (recolhida de uma placa de TSA (15 g/L) caseína enzimática hidrolisada, 5 g/L digestão papaica da soja, 5 g/L cloreto de sódio, 15 g/L agar), inoculada em meio líquido TSB. O matraz foi incubado a 37 °C 120 rpm, *overnight*. Foi adicionado 100 µl de suspensão bacteriana a placas de TSA sólido, com posterior adição de 3 ml de meio TSA 0.5 %. Para as estirpes do género *Lactobacillus* foi utilizado o mesmo método anterior descrito com utilização de placas de MRS (10 g/L Peptona proteose, 10 g/L extrato de carne, 5 g/L extrato de levedura, 20 g/L dextrose, 1 g/L polisorbato 80, 2 g/L citrato de amônia, 5 g/L acetato de sódio, 0.10 g/L sulfato de magnésio, 0.05 sulfato de manganês, 2 g/L fosfato dipotássico) sólido e MRS 0.5 % (3ml) utilizado sobre a suspensão de bactéria. Depois de as placas

solidificarem, foram incubadas a 37 °C *overnight* após o que se verificou se existiam ou não halos de inibição bacteriana.

2.3. Obtenção da endolisina através do fago PhilBB_PI23

2.3.1. Análise Bioinformática

O genoma do fago philBB_PI23 foi sequenciado e anotado (Oliveira *et al.*, 2013). Através da análise *in silico* desse genoma, foi verificada a presença de uma endolisina com sequência nucleotídica codificada pela CDS 21, pertencente à classe das amidases, uma *N*-acetylmuramoyl-*L*-alanine amidase. Esta enzima foi denominada por PlyPI23. Recorreu-se à ferramenta Blastp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para verificar a existência de homologias com outras proteínas depositados no GenBank e ao Pfam (<http://pfam.xfam.org>) para analisar os domínios funcionais da endolisina (catalítico e de ligação à parede celular) (Anexo IV figura A4.1). Considerou-se significativo um *cutoff* de 1×10^{-5} e uma cobertura de sequência de aminoácidos de 80 %.

2.3.2. Clonagem expressão e purificação da PlyPI23

Tabela 2.2. *Primer's* usados durante o processo de clonagem da endolisina.

Nome	Sequência	Tamanho produto PCR	Aplicação	Referência
Ply23Foward Ply23Reverse	5'-AGAAGCCATATGATGGAAATCAGACAGATGCTAGTAGGA-3' 5'-TACGATGGATCCTCACAGGCACCCACTCGCCAAAA-3'	691 bp	Amplificação gene endolisina	Desenhados para este trabalho
T7promotor T7terminador	5'- TAATACGACTCACTATAGGG-3' 5' CTAGTTATTGCTCAGCGGTG 3'	967 bp	Confirmação da inserção do gene endolisina	T7 promoter primer #69348-3 novagen T7 terminator primer #69337-3 novagen

2.3.2.1. Construção do plasmídeo recombinante

Para amplificar a sequência de endolisina identificada no fago philBB_PI23, extraiu-se e purificou-se o ADN do fago. Para tal, a 250 µl de fago com uma concentração superior a 10^8 PFU.ml⁻¹ adicionou-se proteinase K (50 µg/µl) e incubou-se a amostra a 56 °C, *overnight*. Após este passo, a purificação prosseguiu usando um kit comercial (GRS Viral DNA/RNA Purification Kit, GRISP) de acordo com as recomendações do fabricante.

Após purificação do ADN do fago, procedeu-se à realização do PCR, com o objetivo de amplificar o

gene da endolisina no *gene product* (gp) 21, e para tal foram usados os *primers* Ply23Forward e Ply23Reverse (Tabela 2.2.), em que as sequências sublinhadas correspondem aos locais de restrição das enzimas *NdeI* e *BamHI*. A reação de PCR foi realizada num termociclador MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler, BioRad com volume total de 20 µl, contendo 2 µl de ADN de fago, tampão de reação (1x) fornecido com a enzima, e contendo 1.5 mM MgCl₂, 0,1 U de KapaTaq (Kapa Biosystems), 250 mM de dNTPs e 0.5 mM de cada *primer*. A reação de PCR foi definida com um passo inicial de desnaturação a 95°C durante 5 min, seguida por 35 ciclos de: desnaturação do ADN a 95 °C por 30 s, emparelhamento dos *primers* a 53 °C durante 30 s e extensão a 72 °C por 2 min. A extensão final foi programada a 72 °C, durante 5 min.

Apos o reação de PCR as amostras foram carregadas num gel de agarose (1 %), em tampão TAE, e sujeitas a uma eletroforese de 90 Volts. Utilizou-se o corante de ADN SYBR Safe (Nzytech) e as bandas foram visualizadas por luz UV.

Para a clonagem foi usado o plasmídeo pET-28a (Novagen) que contém na sequência um gene de resistência à canamicina (KanR), e que codifica um cauda de histidinas (His)-tag na região N-terminal. Este plasmídeo foi inserido em células de *E. coli* JM109 (Promega) que contém uma cópia do cromossoma do gene da RNA polimerase do fago T7, que permite um elevado nível de expressão.

O ADN do plasmídeo foi extraído usando o kit NucleoSpin Plasmid – Macherey-Nagel de acordo com as instruções do fabricante.

O produto de PCR obtido anteriormente, bem como o ADN plasmídico foram purificados pelo kit Nucleo Spin Gel and PCR Clean up (Macherey-Nagel) seguindo as recomendações do fabricante, com exceção para o volume usado na eluição que foi de 20 µl. A concentração de ambos foi obtida através da medição da absorvância a 260 nm utilizando um espectrofotómetro de DU-600 (Beckman, Fullerton, CA).

Após purificação, realizou-se a digestão enzimática do ADN do plasmídeo pET28a (2 µg ADN/ 30 µl de reação) e do produto de PCR (2 µg ADN/ 30 µl de reação) com a *BamHI* (30U) e *NdeI* (30U) em simultâneo, num volume total de 30 µl. A incubação ocorreu durante 3 horas a 37 °C.

Os produtos da digestão foram novamente purificados (individualmente, e utilizando o mesmo kit anteriormente mencionado), e de seguida procedeu-se à ligação do produto de PCR (com a sequência do gene da endolisina) ao plasmídeo, através da reação com a enzima T4 ADN ligase (NEB), *overnight*, a 16 °C. A reação ocorreu na razão de 3:1 (v/v) do pET28a e produto PCR, com

T4 ADN ligase (1 U/μl) e 2 μl tampão, num volume final de 20 μl.

2.3.2.2. Transformação

O plasmídeo recombinante foi transportado para o interior de células competentes (bactérias viáveis mas cuja parede celular se encontra fragilizada, facilitando a entrada de material genético estranho), neste caso a *E. coli* JM109, obtidas pelo método descrito por Seidman e Brent (1998). Para induzir esta transformação, um volume mínimo de 10 ng de plasmídeo recombinante foi cuidadosamente homogeneizado numa suspensão de 100 μl de células competentes, e o resultante sujeito a um choque térmico: 20 minutos em gelo; 60 segundos a 42 °C e novamente 4 minutos em gelo. Adicionou-se 300 μl de meio SOC (20 g/L triptona, 5 g/L extrato levedura, 4.8 g/L MgSO₄, 3.60 g/L glucose, 0.5 g/L NaCl, 0.186 g/L KCl) e incubou-se a 37 °C durante 90 min. Um volume de 10 μl foi semeado numa placa de LB agar suplementado com 50 μg/ml de canamicina, e o restante volume semeado noutra placa. As placas foram incubadas a 37 °C, *overnight*, para verificação do sucesso da transformação através do aparecimento de colónias de bactéria resistente à canamicina.

Das colónias transformantes bem isoladas, seleccionaram-se algumas (cerca de 12) para confirmar a presença do gene inserido. Para isso, realizou-se um *colony* PCR: cada colónia foi recolhida individualmente e transferida para um tubo com 50 μl de meio LB com antibiótico (50 μg/ml canamicina), que foi incubado durante 2 horas a 37 °C. Os tubos foram depois aquecidos a 95 °C por 10 min e centrifugados durante 5 min a 13 000 xg. Um volume de 2 μl de cada sobrenadante foi usado como *template* no PCR que se seguiu, com os *primers* T7 promotor e o T7 Terminador (Tabela 2.2.). Foram usados 100 μm de cada *primer* e 10 μl de PCR master mix (Promega), num volume total de reação de 20 μl. A reação ocorreu num termociclador (BioRad MJ mini Personal Thermal Cycler) começando com um passo de desnaturação inicial 95 °C 5min, seguido de 30 ciclos de 95 °C, 30 s, 57 °C, 30 s e 72 °C, 3min. A extensão final foi a 72 °C durante 10 min. Uma amostra de 10 μl do produto de PCR foi analisada num gel de 0.8 % agarose com 1x TAE (Tris-Acetato EDTA), corado com SYBR Safe (Nzytech), após corrida a 100 volts. As bandas de ADN foram visualizadas através de luz UV (Gel DocTM XR+ Imager, Bio Rad. As células contendo plasmídeos recombinantes com o tamanho correto foram identificadas, e a respetiva suspensão previamente preparada (foi seleccionada uma apenas) foi sujeita à extração de ADN de plasmídeo com o kit NucleoSpin Plasmid – Macherey-Nagel. Seguiu-se a sequenciação do ADN com os *primers* T7 promotor e terminador, a fim de verificar se a sequência da endolisina estava correta.

2.3.2.3. Inserção em células competentes BL21

As células competentes *E. coli* BL21 foram usadas para clonar os plasmídeos recombinantes após confirmação por sequenciação. A transformação nestas células foi efetuada e verificada como foi descrito em 2.3.2.2 para a *E. coli* JM109. As colónias transformantes foram criopreservadas em meio LB com 15 % glicerol, a -80 °C.

2.3.3. Expressão e purificação da PlyPI23

2.3.3.1. Expressão

Para expressar a endolisina PlyPI23 começou-se por fazer um pré-inóculo de células de BL21 transformadas, em 10 ml de meio LB + canamicina (50 µg/ml), incubado *overnight* a 37 °C e com agitação a 120 rpm. Adicionou-se 1 ml do pré-inóculo a 100 ml de meio LB + canamicina (50 µg/ml), e colocou-se novamente a incubar a 37 °C, 120 rpm até atingir uma D.O_{620nm} de 0.5.

A expressão da endolisina foi então induzida adicionando ao inóculo 0.5 mM de isopropil-b-D-tiogalactopiranosido (IPTG). Duas condições de incubação foram testadas: 16 °C, 150 rpm (MIR-254-PE cooled incubator e Orbital Shakers MIR-S100-PE), *overnight* e 30 °C, 150 rpm (MIR-254-PE cooled incubator e Orbital Shakers MIR-S100-PE) durante 4 horas.

Independentemente das condições de expressão, após incubação as células bacterianas foram centrifugadas a 4 000 xg durante 20 min, e o sedimento foi ressuspensado em 1/25 volumes de tampão de lise (Na₂H₂PO₄ 20 mM, cloreto de sódio 500 mM, pH 7.4) com a adição de 10mM de imidazol. A ruptura celular foi feita por congelação-descongelação (três ciclos, congelação foi efetuada -80 °C e a descongelação à temperatura ambiente), seguido por sonicação (Cole-Parmer, Ultrasonic Processadores) durante 10 ciclos (30 s pulso, 30 s pausa em cada ciclo) com 30 % de amplitude. Os detritos celulares insolúveis foram removidos por centrifugação (9 500 xg, durante 30 min, 4 °C) e o sobrenadante foi filtrado por 0.22 µm.

2.3.3.2. Purificação

A purificação da endolisina foi realizada por cromatografia de afinidade com a utilização de uma coluna de resina Ni-NTA HisTrape™ HP de 1 ml (GE Healthcare). Inicialmente fez-se passar pela coluna uma solução de equilíbrio com tampão lise que continha 10 mM de imidazol (4 ml), após o que se carregou a amostra. Seguiu-se uma fase de lavagem da amostra, com a passagem sucessiva de 4 ml de tampão lise com diferentes concentrações de imidazol, nomeadamente 20 mM e

40 mM de imidazol. Para a eluição da proteína fez-se passar pela coluna três frações de 500 µl de tampão lise com 300 mM de imidazol. A segunda fração foi conservada após análise do gel de SDS-PAGE (ver secção 3.4.2 dos Resultados).

De forma a concentrar e alterar a solução tampão da endolisina foram testados dois métodos: A diálise por membranas Pur-A-Lyzer™ Midi Dialysis Kit Midi 6000 (Sigma-Aldrich), contra Tris 20 mM pH 8 e a ultrafiltração através de membranas Amicon Ultra 0.5 ml (Millipore), em que após a 1ª centrifugação a enzima fica suspensa em Tris pH8 (20 mM). A proteína purificada foi suplementada com 30 % de glicerol que funcionou com crio-protetor e armazenada a -20 °C.

A solubilidade da enzima expressa a 30 °C foi testada em diferentes soluções tampão, nomeadamente: Heppes pH7 e citrato de potássio pH5.

A quantificação da proteína total foi feita usando o kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific), de acordo com as indicações do fabricante. A concentração de proteína foi calculada através da equação da reta de calibração com albumina bovina ($[PlyPI23 \mu\text{g}/\mu\text{l}] = 1049.3 * (D.O_{562\text{nm}} \text{ amostra} - D.O_{562\text{nm}} \text{ branco}) - 173.85$)*fator diluição/1000) (Figura A5.1, Anexo V).

2.3.3.3. Análise em Gel SDS-Page

A análise da expressão da proteína foi realizada através da análise do gel de SDS-page, de forma a confirmar o tamanho e também a pureza da endolisina. Utilizou-se um sistema descontínuo, formado por um gel concentrador e outro separador. Para 1 gel concentrador (numa cassete de 0.75 mm) foi usado 1.8 ml acrilamida 40 %, 0.75 ml Tris-HCl pH 6.8, 3.1 ml H₂O ultra pura, 60 µl SDS 10 %, 3 µl TEMED e 300 µl PSA 10%. O gel separador (1 gel com cassete 0.75 mm) foi preparado com 375 µl acrilamida a 40%, 1 ml Tris-HCl pH 8.8, 2.31 ml H₂O ultra pura, 40 µl SDS 10 %, 3 µl TEMED e 200 µl PSA 10 %. O reagente TEMED e o PSA apenas são adicionados no final da preparação de cada gel.

2.4. Caracterização e avaliação da atividade lítica

A atividade lítica da endolisina foi determinada comparando a variação da densidade ótica (DO_{620nm}) em suspensões de *P. larvae* após a adição da PlyPI23, com a variação em suspensões onde se substituiu o volume de enzima pelo seu tampão de armazenamento, neste caso Tris pH8. Estas medições foram efetuadas num espectrofotómetro Multiskan FC (Thermo Scientific).

O inóculo de células de *P. larvae* foi feito a partir de uma única colónia (recolhida de uma placa de MYPGP agar), inoculada em meio líquido MYPGP. O matraz foi incubado a 37 °C, 120 rpm, *overnight* (obtenção fase exponencial da estirpe) (anexo II figura A2.1). A suspensão foi depois centrifugada a 13000 xg por 5 min e ressuspensa na solução de teste (dependente dos ensaios). Este procedimento foi repetido 2 vezes, e na última, as células foram ressuspensas no volume adequado para se obter uma OD_{620nm} entre 0.6 e 0.8.

Os ensaios foram efetuados a 37 °C (temperatura similar à da colmeia), com agitação (120 rpm) durante 60 ou 120 min. Com a exceção do espectro lítico todos os ensaios foram realizados com a estirpe H23, a estirpe hospedeira do fago philBB_P123.

A atividade lítica foi calculada da seguinte forma: $[DO_{620nm} (\text{reação com PlyPI23 } t_0 - \text{reação com PlyPI23 } t_n) - DO_{620nm} (\text{Controlo } t_0 - \text{Controlo } t_n)] / t_0 DO_{620nm} \text{ Controlo}] * 100$. A atividade relativa foi calculada usando os valores de atividade absoluta para cada parâmetro divididos pelo valor da maior atividade obtida em cada ensaio.

Para alguns dos testes, a atividade lítica foi avaliada pela variação da concentração, medida por contagem das unidades formadoras de colónias (CFU). Após a adição de PlyPI23, a concentração de bactérias foi avaliado no tempo, aos 0, 30, 60 e 120 min. A atividade lítica dos CFU foi calculada da seguinte forma: $[CFU.ml^{-1} (\log 10) (\text{reação com PlyPI23 } t_0 - \text{reação com PlyPI23 } t_n) - CFU.ml^{-1} (\log 10) (\text{Controlo } t_0 - \text{Controlo } t_n)] / t_0 CFU.ml^{-1} (\log 10) \text{ Controlo}] * 100$.

Num teste preliminar testou-se o efeito de três concentrações diferentes de endolisina 1, 2 e 3 μM na diminuição da DO_{620nm} de H23 foi avaliada, para definir a concentração a ser utilizada nos testes subsequentes.

Todas as experiências foram realizadas em pelo menos três ensaios independentes.

2.4.1. Testes de estabilidade da PlyPI23 a diferentes temperaturas

A estabilidade da endolisina com a temperatura foi testada através da monitorização semanal da sua atividade a diferentes temperaturas: temperatura ambiente (TA), 4 °C, -20 °C e -80 °C. Para tal acompanhou-se a atividade da PlyPI23 pela diminuição da D.O_{620nm} em Tris 20 mM pH7.

2.4.1.1. Efeito do pH

O efeito do pH na atividade da endolisina foi avaliado pela adição da enzima a uma suspensão bacteriana da estirpe H23 em Tris 20 mM acertado a diferentes valores de pH (pH 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0). Os ensaios foram realizados com 2 µM de PlyPI23 por reação seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente.

2.4.1.2. Efeito da força iónica

A influência do NaCl na atividade lítica da PlyPI23 foi testada nos valores de pH 5, 6 e 7. Utilizaram-se 2 µM de PlyPI23 por reação. Para cada valor de pH foram adicionados várias concentrações de NaCl nomeadamente 0, 50, 100, 150 e 200 mM.

2.4.1.3. Efeito Zinco

O efeito da adição de zinco na atividade da PlyPI23 foi testado em diferentes valores de pH, nomeadamente 5, 6 e 7, suplementados com 200 mM NaCl. A concentração de zinco usada foi 0.1 mM e monitorizou-se os ensaios nos tempos 60 e 120 min.

2.4.1.4. Espectro lítico PlyPI23

O espectro lítico da endolisina PlyPI23 foi realizado pela medição da diminuição da DO_{620nm}. Seguindo o protocolo descrito em 2.3, as diferentes estirpes foram ressuspensas em Tris pH3 (20 mM). O estudo foi realizado em estirpes de *P. larvae* e noutras estirpes Gram-positivas nomeadamente: *B.Cereus*, *B.subtilis subsp subtilis DSMZ 10*, *B.thuringiensis CECT 197*, *B. coagulans CECT 12*, *L. pentosus CECT 4023*, *L. Lactis*, *L. paracasei CECT 227*. O inóculo de células de *Bacillus* foi feito a partir de uma única colónia (recolhida de uma placa de TSA), inoculada em meio líquido TSB. O matraz foi incubado a 37 °C a 120 rpm *overnight*. A suspensão foi depois centrifugada a 13 000 xg durante 5 min e ressuspensa na solução de teste. Estes procedimentos foram repetidos 2 vezes, e na última, as células foram ressuspensas no volume adequado para se obter uma D.O_{620nm} entre 0.6 e 0.8. Posteriormente seguiu-se o mesmo procedimento usados nas estirpes de *P. larvae*. Para as

estirpes do género *Lactobacillus* foi utilizado o mesmo método utilizado para as estirpes de *Bacillus* com a exceção que o meio utilizado foi MRS.

A morte celular das bactérias foi confirmada com a estirpe H23, através de uma adaptação do método sugerido por Boll (2013), pela comparação da quantidade da proteína no sobrenadante da suspensão celular antes e depois da ação da enzima (através do kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo scientific)). O cálculo da variação da absorvância a 562 nm foi efetuado através da seguinte equação: $(DO_{562nm} \text{PlyPL23} + \text{pH 3 20 mM Tris} - D.O_{562nm} \text{ PlyPI23}) - DO_{562nm} \text{ pH 3 20 mM TriS}$ Considera-se a morte celular bacteriana quando a variação da $DO_{562nm} > 0.07$ (Boll, 2013).

2.4.1.5. Efeito da sacarose, geleia real e do suco de larva

O efeito da solução de sacarose 50 % na atividade da PlyPI23 foi avaliado através do acompanhamento da variação da DO_{620nm} como descrito no ponto 2.3 deste capítulo. Para tal a PlyPI23 foi previamente diluída, na solução de sacarose 50 %, de modo a que a concentração final fosse de 20 μM . Em seguida foram adicionados 10 μl desta solução a 90 μl de suspensão bacteriana de H23 em Tris pH 7, 200 mM NaCl, (concentração final de enzima de 2 μM).

A avaliação do efeito de geleia real na atividade PlyPI23 foi realizado por variação da DO_{620nm} e por variação de CFU.ml^{-1} . Inicialmente, a PlyPI23 foi diluída em geleia real para se obter uma concentração final de 20 μM . Esta suspensão foi incubada durante 30 min a 37 °C. Posteriormente 20 μl da suspensão foi adicionada a 180 μl de suspensão bacteriana H23 em Tris pH 7 200 mM NaCl (concentração final de 2 μM). No ensaio por contagem direta de CFU.ml^{-1} usou-se uma concentração inicial de bactéria de 10^7CFU.ml^{-1} e o efeito geleia real foi avaliado aos 0, 30, 60 e 120min.

Para avaliar o efeito do conteúdo intestinal das larvas na atividade da PlyPI23 foram recolhidas larvas de abelhas em diferentes estados larvares. As larvas foram recolhidas com a ajuda de uma agulha a partir de uma colónia de abelhas duma colmeia Portuguesa. As larvas foram pesadas e suspensas em NaCl a 0.9 %, numa proporção de 1:1 (m/v). Posteriormente adicionou-se esferas de vidro à amostra (para macerar as larvas) e homogeneizou-se com ajuda do vortex durante 2 minutos. Obtendo-se um homogeneizado larvar (HL) que foi dividido em dois grupos, de acordo com o tamanho das larvas: as larvas do 1º e 2º estados larvares, de comprimento 0.33 mm e 0.47 mm, foram denominadas como HL1, e as larvas do 3º e 4º estado, 0.70 mm e 1.05 mm, respetivamente, foram denominadas HL2 (anexo VI figura A6.1 E a6.2) (Human *et al.*, 2013). O HL foi posteriormente

filtrado com filtros PES de 0.22 μm (Whatman) e conservado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

O efeito do HL na atividade da PlyPI23 foi avaliado por variação da concentração em $\text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$ nos tempos 0, 15, 30 e 60 min, a partir de uma concentração inicial de bactérias de $10^5\text{ CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$. Devido a falta de recursos este ensaio apenas foi realizado uma vez, no entanto objetivo de verificar a estabilidade e tendência da atividade da enzima não são postos em causa.

Para avaliar a estabilidade da endolisina nas condições de campo consideradas importantes para a aplicação prática, os ensaios de lise foram realizados com a estirpe H23 suspensa simultaneamente numa solução com 50 % de sacarose, geleia real 1:1 (m/v) e 200 mM de NaCl, a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 6 horas e à qual se adicionou 2 μM de enzima. Mediu-se a atividade a $\text{D.O}_{620\text{nm}}$ (como descrito anteriormente) logo após a adição da PlyPI23 e ao fim de incubação a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.4.1.6. Efeito da concentração inicial de bactéria e da concentração de endolisina

O efeito da concentração inicial de bactéria na atividade da endolisina foi testado através da monitorização dos CFU ao longo do tempo, usando concentrações iniciais de bactéria (H23) de 10^4 , 10^5 e $10^6\text{ CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$. Para cada concentração de bactéria foram testadas duas concentrações de endolisina diferentes, 2.0 μM e 0.2 μM .

A concentração de bactéria foi monitorizada aos 0, 30, 60, 120 min. Foram plaqueados 10 μl de amostra em cada tempo de reação com a exceção dos 120min, onde foram plaqueados 100 μl de amostra para aumentar o limite de deteção para 10 CFU/ml .

2.5. Análise estatística

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada usando o software GraphPad Prism 6. Foram usadas as médias e desvios-padrão (DP) resultantes de três ensaios independentes, e os resultados foram apresentados como média \pm DP. Os ensaios foram comparados por análise de variância de um (One-way ANOVA) ou dois fatores (two-way ANOVA) dependendo do ensaio, com teste post-hoc de Bonferroni. As diferenças entre as condições foram consideradas estatisticamente significativas quando *p-value* <0.05 .

Resultados

3. RESULTADOS

3.1. Isolamento e caracterização das estirpes de *Paenibacillus larvae*

A recolha de amostras de mel, cera e larvas mortas possibilitou o isolamento de 42 estirpes suspeitas de pertencerem à espécie *P. larvae*. A amplificação do gene de ARN ribossomal 16S por PCR a partir do ADN de cada uma das amostras confirmou a existência de 21 estirpes de *P. larvae* (12 foram isoladas a partir do mel, 1 a partir de cera e 8 a partir de larvas mortas) (Tabela 3.3). No âmbito de um outro trabalho do grupo (Grosboillot, 2013), através da metodologia de rep-PCR, verificou-se que 16 das estirpes de *P. larvae* pertencem ao genótipo ERIC I, 4 ao genótipo ERIC II e uma delas não foi possível identificar, tendo-se obtido um perfil inconclusivo. Como descrito na tabela 3.3, a estirpe H23, usada para amplificar o fago philBB_PI23 e para avaliar a atividade da endolisina, pertence ao genótipo ERIC I (anexo I figura A1.1).

3.2. Isolamentos de novos bacteriófagos

As amostras utilizadas para o isolamento de bacteriófagos, nomeadamente solo e efluente das redondezas de apiários, não possibilitaram a obtenção de novos fagos por nenhuma das metodologias utilizadas (co-cultura das amostras em meio líquido e incorporação das amostras com cada estirpe bacteriana, em meio sólido).

3.3. Espectro lítico do fago philBB_PI23

Após produção do fago philBB_PI23, avaliou-se o seu espectro lítico nas 21 estirpes de *P. larvae* isoladas, tendo-se verificado atividade lítica em 15 dessas estirpes (71.4 %). As outras espécies de bactérias gram-positivas testadas, não se mostraram sensíveis à ação do philBB_PI23 (Tabela 3.3).

3.4. Obtenção da endolisina através do fago philBB_PI23

3.4.1. Análise Bioinformática

A análise bioinformática do genoma do fago philBB_PI23, um fago temperado da família *Siphoviridae*, possibilitou a identificação de uma endolisina no *gene product* (gp) 21 pertencente à família das amidases (Oliveira *et al*, 2013). Esta proteína possui uma estrutura modular, peso molecular de 25.8 kDa e um ponto isoelétrico de 6.08. A análise da sequência proteica através do Pfam e do Blastp demonstraram que o domínio catalítico, *N*-acetylmuramoyl-*L*-alanine amidase, está

situado na região N-terminal e abrange cerca de dois terços da proteína (figura 3.1), existindo uma parte não identificada (cerca de um terço), localizado na região C-terminal. Esta deverá corresponder ao domínio de ligação à parede celular bacteriana (sítio de ligação química), cuja análise da sequência revelou, ausência de qualquer homologia com outros domínios já identificados.

O alinhamento da sequência proteica através do Blastp mostrou que, de uma forma geral, esta endolisina possui grande homologia (E value $<8e-168$) com proteínas de algumas espécies bacterianas tais como: *Paenibacillus larvae*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis* e também em fagos (*Bacillus* sp.) (Tabela 3.1).

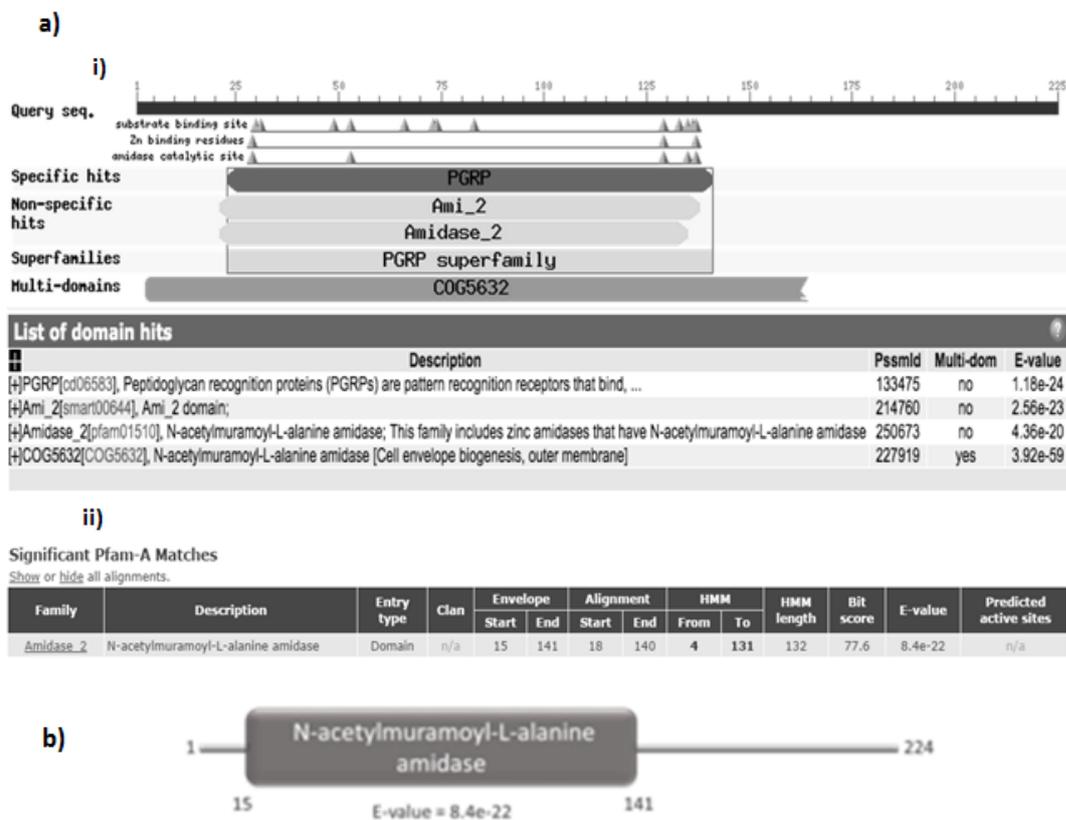


Figura 3.1. **a)** Alinhamento da sequência proteica da endolisina através do programa pfam (i) e do Blastp (ii). **b)** Representação esquemática da organização dos domínios da endolisina.

Tabela 3.1. Homologia da sequência proteica da PlyPI23 através do Blastp, para: *Paenibacillus larvae*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis* e fagos de *Bacillus* sp.

Descrição	Cobertura	Identidade	<i>E value</i>
<i>N</i> -acetylmuramoyl- <i>L</i> -alanine amidase [<i>Paenibacillus larvae</i> subsp. <i>larvae</i> DSM 25719]	100%	100%	8e-168
<i>N</i> -acetylmuramoyl- <i>L</i> -alanine amidase [<i>Paenibacillus larvae</i> subsp. <i>larvae</i> DSM 25719]	98%	94%	1e-155
<i>N</i> -acetylmuramoyl- <i>L</i> -alanine amidase [<i>Bacillus cereus</i>]	71%	77%	9e-84
<i>N</i> -acetylmuramoyl- <i>L</i> -alanine amidase [<i>Bacillus thuringiensis</i>]	70%	77%	5e-78
<i>N</i> -acetylmuramoyl- <i>L</i> -alanine amidase [<i>Bacillus anthracis</i>]	71%	73%	1e-78
prophage LambdaBa01, <i>N</i> -acetylmuramoyl- <i>L</i> -alanine amidase, family 2 [<i>Bacillus thuringiensis</i>]	71%	73%	9e-80
<i>N</i> -acetylmuramoyl- <i>L</i> -alanine amidase [<i>Bacillus</i> phage Gamma, Cherry, Wbeta, Fah]	68%	72%	7e-79

3.4.2. Clonagem, expressão e purificação da endolisina PlyPI23

Após a clonagem do plasmídeo recombinante em células de *E. coli* JM109, a análise dos resultados do PCR e posterior sequenciação do fragmento, comprovaram o sucesso da inserção do gene de interesse com a correta sequência nucleotídica. Posteriormente, a proteína correspondente a essa sequência foi expressa sob diferentes condições (16 °C *overnight* e 30 °C durante 4 horas) e purificada por cromatografia de afinidade. A análise do gel de SDS-page ilustrado na figura 3.2, mostra a existência de uma única banda de cerca de 25 kDa, consistente com o tamanho molecular calculado para esta enzima, e de intensidade semelhante para qualquer das duas condições de temperatura testadas. A endolisina obtida foi assim designada por PlyPI23.

Dada a semelhança de resultados para as temperaturas testadas, optou-se por usar a expressão a 30 °C, que possibilitava uma maior rapidez no procedimento. Após alterar (por ultrafiltração) a solução tampão da enzima, que continha Imidazol, para solução Tris pH 8, observou-se a formação de um precipitado branco no fundo do tubo, que não desapareceu com a agitação. Assim, de modo a melhorar a solubilidade da proteína, outras soluções tampão de armazenamento da enzima foram testadas: Heppes pH 7 e citrato de potássio pH 5. No entanto, nenhuma das soluções utilizadas resultou num aumento de solubilidade da proteína. Apenas foi possível obter a enzima completamente solubilizada, sem a observação de qualquer precipitado, quando se alterou a

temperatura de expressão para 16 °C. Neste caso o tampão de armazenamento usado foi o Tris pH 8 (20 mM).

Na otimização dos procedimentos para a concentração da enzima e troca do tampão de armazenamento da PlyPI23, dois processos foram testados: a dialise e a ultracentrifugação. A partir da concentração de proteína obtida antes e após cada procedimento foi possível verificar a diminuição de 28.22 μ M para 9.24 μ M com o uso de membranas de diálise, e um aumento de 28.22 μ M para 71.52 μ M quando se usaram as membranas de ultracentrifugação.

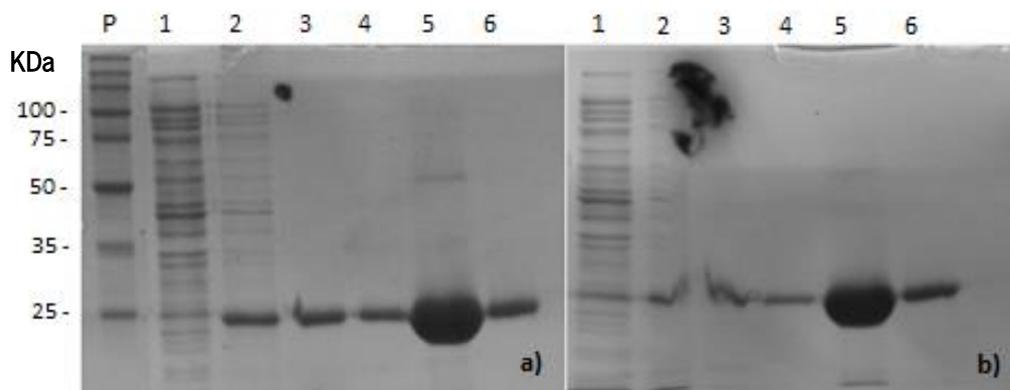


Figura 3.2. Gel de SDS-PAGE carregado com diferentes frações resultantes da expressão da PlyPI23 à temperatura de a) 16 °C e b) 30 °C. P- Marcador molecular; 1- Amostra; 2- Lavagem com 20 mM de imidazol; 3- Lavagem com 40 mM de imidazol 4, 5, 6 - frações eluídas em 300 mM imidazol.

3.4.3. Caracterização e avaliação da atividade lítica

A variação de DO_{620nm} na suspensão bacteriana após 120 min de ação de 1, 2 e 3 μ M de enzima (em Tris pH 7, 20 mM), permitiu observar que a atividade obtida com uma concentração de 1 μ M foi significativamente diferente da obtida quando se usou 3 μ M (p-value <0.01). Por outro lado a concentração de 2 e 3 μ M apresentam o mesmo efeito sobre a atividade da PlyPI23 (figura 3.3.). Por esta razão a concentração de enzima usada nos ensaios seguintes foi a mais baixa, 2 μ M.

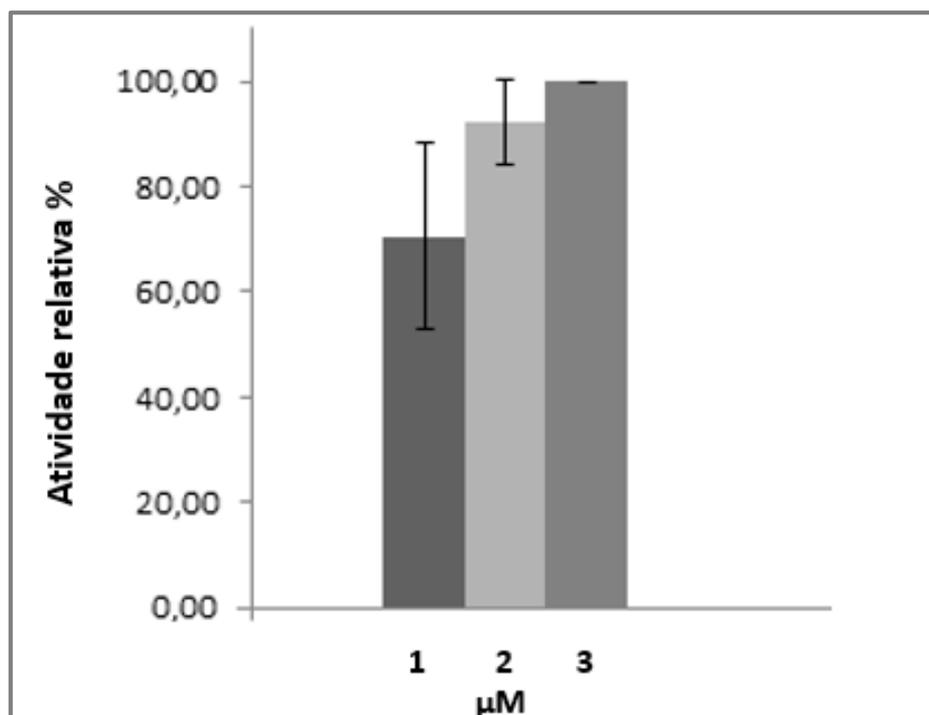


Figura 3.3. Atividade relativa (%) da PlyPI23 nas concentrações de 1, 2 e 3 μM , obtida por variação da $\text{DO}_{620\text{nm}}$, aos 120 min de reação. A atividade relativa de referência (100 %) correspondeu a 60 % de atividade lítica (figura A7.1 Anexo VII).

3.4.3.1. Testes de estabilidade da PlyPI23 a diferentes temperaturas

A estabilidade da endolisina à temperatura de armazenamento foi testada através da monitorização semanal da sua atividade a diferentes temperaturas: temperatura ambiente (TA), 4 °C, -20 °C e -80 °C.

Quando armazenada à TA a endolisina perdeu atividade ao fim de uma dia, enquanto que, a 4 °C perdeu atividade após 5 semanas (Tabela 3.2). Os resultados da atividade da enzima armazenada a -80 °C demonstram que imediatamente após a descongelação a endolisina não atuou, sendo este resultado reversível quando colocado a -20 °C. A esta temperatura a endolisina permanece ativa, sem perda de atividade, relativamente à obtida inicialmente, por pelo menos 16 semanas. Os testes da atividade da endolisina após liofilização mostram que este processo não afetou a ação da mesma (dados não mostrados).

Tabela 3.2. Atividade lítica da PlyPI23 a diferentes temperaturas e ao longo do tempo. ■ – perda de atividade da enzima ; □ - enzima ativa.

Temperatura °C	Tempo (semanas)															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
TA	*	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
4°C	□	□	□	□	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
-20°C	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
-80°C	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

*perdeu atividade ao fim de um dia

3.4.3.2. Efeito do pH

O efeito do pH na atividade da PlyPI23 foi avaliado usando uma gama de pH entre 3 e 9. Na figura 3.4 são apresentados os resultados da atividade relativa (%) após 60 e 120 min. De uma forma geral, a atividade registada após 120 min foi idêntica à obtida aos 60 min com a exceção do pH 9 (p-value < 0.05). Analisando os resultados aos 120min observou-se que a endolisina atuou melhor a pH3, seguido do pH4 (p value < 0.01). Embora com atividade mais baixa, a gama de valores de pH entre 5 e 9 apresentou igualmente bons resultados, não havendo diferenças significativas entre a atividade obtida para cada um deles (p-value > 0.05) (Figura 3.4). Para valores de pH de 2 e 10 não foi possível a recuperação as células bacterianas viáveis e deste modo a atividade da endolisina para estes valores de pH não foi avaliada.

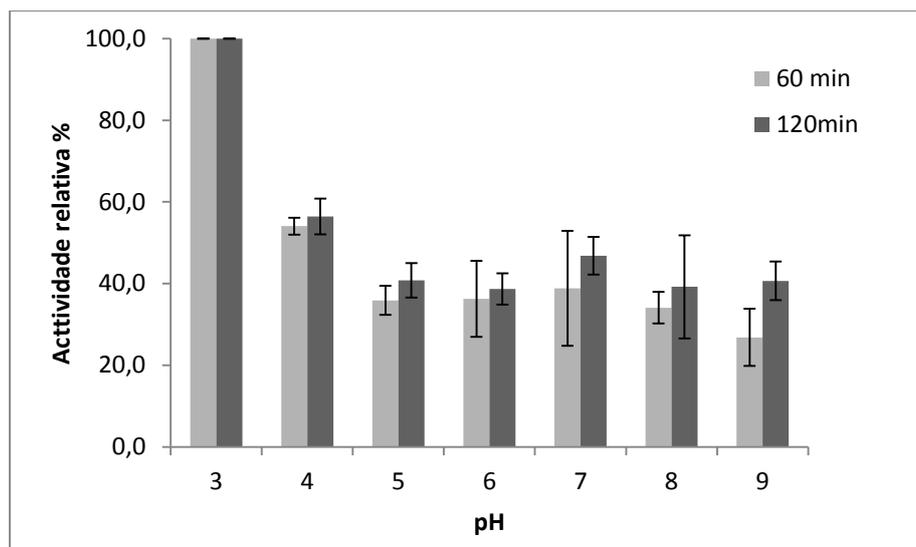


Figura 3.4. Atividade relativa (%) para os valores de pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, e 9, após 60 e 120min de reação. A atividade relativa de referência (100 %) correspondeu a cerca de 80 % de atividade lítica (figura A7.2 Anexo VII).

3.4.3.3. Efeito da força iónica

O efeito da força iónica foi testado usando 0, 50, 100, 150 e 200 mM NaCl, e para os valores de pH 5, 6 e 7, uma vez que mimetizam a gama de pH reportada na literatura para o conteúdo gástrico de larvas e abelhas adultas (Alvarado *et al.*, 2013). A análise estatística demonstrou que, a pH 5 não houve diferença significativa na atividade da enzima para qualquer uma das concentrações de NaCl testadas (p -value > 0.05). Pelo contrário, a pH 6 a concentração de 150 e 200 mM NaCl melhorou a atividade da endolisina quando comparado à concentração de 50 mM NaCl (p -value < 0.01). A pH 7, a adição de 200 mM NaCl melhorou a atividade da enzima relativamente a 0 e 50 mM NaCl (p -value < 0.01), e por isso, sempre que se considerou pertinente, em ensaios seguintes, o tampão Tris pH7 foi aditivado com 200 mM NaCl (Figura 3.5.).

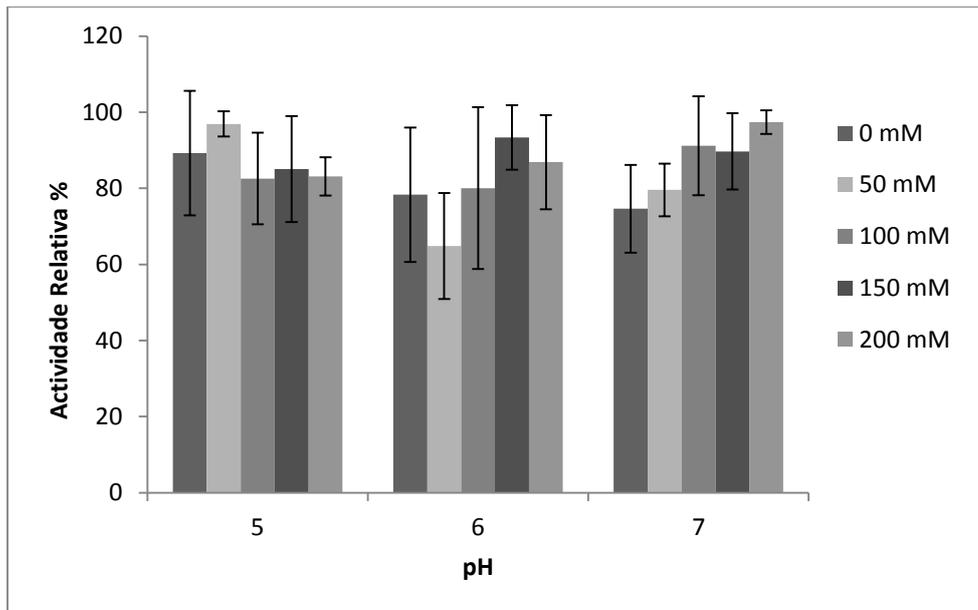


Figura 3.5. Efeito da adição de 0, 50, 100, 150 e 200 mM NaCl a soluções com pH 5,6 e 7 sobre a atividade relativa (%) da endolisina. Dados relativos aos 120 min de reação. A atividade relativa de referência (97 %) correspondeu a 50.4 % de atividade lítica (figura A7.3 Anexo VII).

3.4.3.4. Efeito adição ião zinco

A análise bioinformática da enzima PlyPI23 mostrou que esta possui na sua estrutura um domínio de ligação ao ião zinco (figura 3.6.). Com base neste facto, realizaram-se ensaios para avaliar a influência deste ião na atividade da endolisina, através da adição de Zn^{2+} (0.1 mM) a soluções de Tris pH 5, 6 e 7. Os resultados mostraram que a adição do ião zinco não alterou a atividade da endolisina (p -value > 0.05) para o pH 5 e 7 (figura 3.6). Para valores de pH 6 a atividade da enzima é menor quando é adicionado o ião zinco (p -value < 0.01).

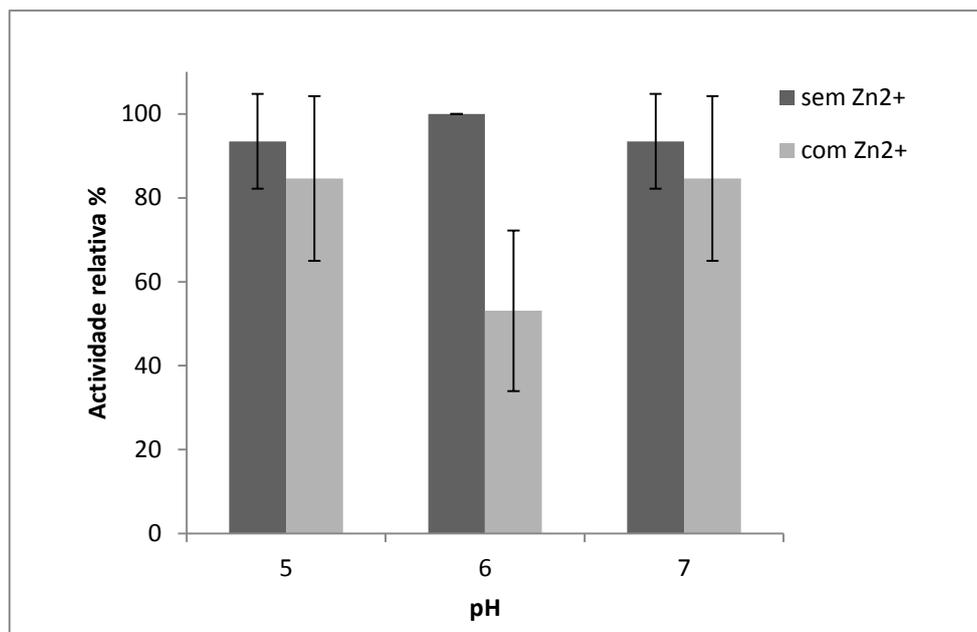


Figura 3.6. Atividade relativa (%) da PlyPI23 com e sem a adição de Zn²⁺ (0.1 mM), em soluções de pH 5, 6 e 7. Dados relativos aos 120 min de reação. A atividade relativa de referência (100 %) correspondeu a 48.46 % de atividade lítica (figura A7.4 Anexo VII).

3.4.3.5. Espectro lítico

Com base na análise dos resultados obtidos respeitantes ao efeito do pH, a avaliação do espectro lítico da PlyPI23 foi realizado suspendendo as células na solução que possibilitou a atividade lítica mais elevada, neste caso o Tris pH 3 (20 mM).

Os resultados de variação de DO_{620nm} após a adição de PlyPI23 a cada estirpe mostraram que esta enzima foi ativa para a totalidade (100%) das estirpes de *P. larvae*, contrariamente ao que sucedeu com as outras bactérias gram-positivas testadas, onde não se verificou diminuição de densidade celular, com exceção da estirpe de *B. coagulans*. (Tabela 3.3).

Nestes ensaios um resultado positivo correspondeu ao aparecimento de um aglomerado celular no centro do poço (Figura A7.6., anexo VII), e a uma diminuição de DO_{620nm} após homogeneização do aglomerado. A morte celular foi confirmada com a estirpe H23, através de uma adaptação do método sugerido por Boll (2013), recorrendo à variação da absorvância (DO_{562nm}) após 120 min, tendo-se verificado um aumento de absorvância de 0.26 nm para 0.76 nm. O resultado do cálculo da variação da absorvância a 562nm foi de 0,326 nm.

Tabela 3.3. Espectro lítico do fago phiIBB_PI23 e da PlyPI23 nas estirpes de *P. larvae* e em algumas bactérias do género *Bacillus* e *Lactobacillus*.

Estirpe <i>P. larvae</i>	Origem da Amostra	Genótipo	PhiIBB_PI23	PlyPI23
H1	Mel	ERIC I	+	+
H2	Mel	ERIC II	+	+
H3	Mel	ERIC I	+	+
H7	Mel	ERIC I	+	+
H7b2	Mel	ERIC I	+	+
H10	Mel	ERIC II	+	+
H12	Mel	ERIC II	+	+
H13	Mel	ERIC I	+	+
H14	Mel	ERIC I	+	+
H17	Mel	+	-	+
H18	Mel	ERIC I	+	+
H19	Mel	ERIC II	+	+
H21	Larvas mortas	ERIC I	-	+
H23*	Larvas mortas	ERIC I	+	+
H27	Larvas mortas	ERIC I	+	+
H28	Cera	ERIC I	-	+
H29	Larvas mortas	ERIC I	+	+
H30a	Larvas mortas	ERIC I	+	+
H30b	Larvas mortas	ERIC I	-	+
H30c	Larvas mortas	ERIC I	-	+
H31	Larvas mortas	ERIC I	+	+
<i>B. Cereus</i>	Colecção CEB	N/A	-	-
<i>Bacillus subtilis subsp subtilis</i>	DSMZ 10	N/A	-	-
<i>B. thuringiensis</i>	CECT 197	N/A	-	-
<i>Bacillus coagulans</i>	CECT 12	N/A	-	+
<i>Lactobacillus pentosus</i>	CECT 4023	N/A	-	-
<i>Lactobacillus. lactis</i>	Colecção CEB	N/A	-	-
<i>Lactobacillus paracasei</i>	CECT 227	N/A	-	-

N/A- não aplicavel

* descrita como H23 em Oliveira *et al.* (2013)

3.4.3.6. Efeito da sacarose, geleia real e suco de larva na atividade da PlyPI23

Com base na análise dos resultados obtidos respeitantes ao efeito do pH, da concentração de NaCl e de Zn^{2+} na atividade da PlyPI23, e tendo em conta as condições ambientais a que a enzima será sujeita na aplicação *in vivo*, a solução de reação usada nos ensaios seguintes foi de Tris pH 7 (20 mM), suplementada com 200 mM de NaCl.

Um dos desafios da aplicação da PlyPI23 às larvas das abelhas são as várias condições ambientais da colmeia a que esta irá estar sujeita. Por esta razão avaliou-se o efeito da sacarose, do conteúdo larvar (através de homogeneizado de larvas) e da geleia real sobre a atividade da PlyPI23.

Os resultados da atividade da enzima demonstram que o contato prévio da endolisina com uma solução de sacarose 50 % não afetou a atividade da PlyPI23 (p-value > 0.05) (figura 3.7).

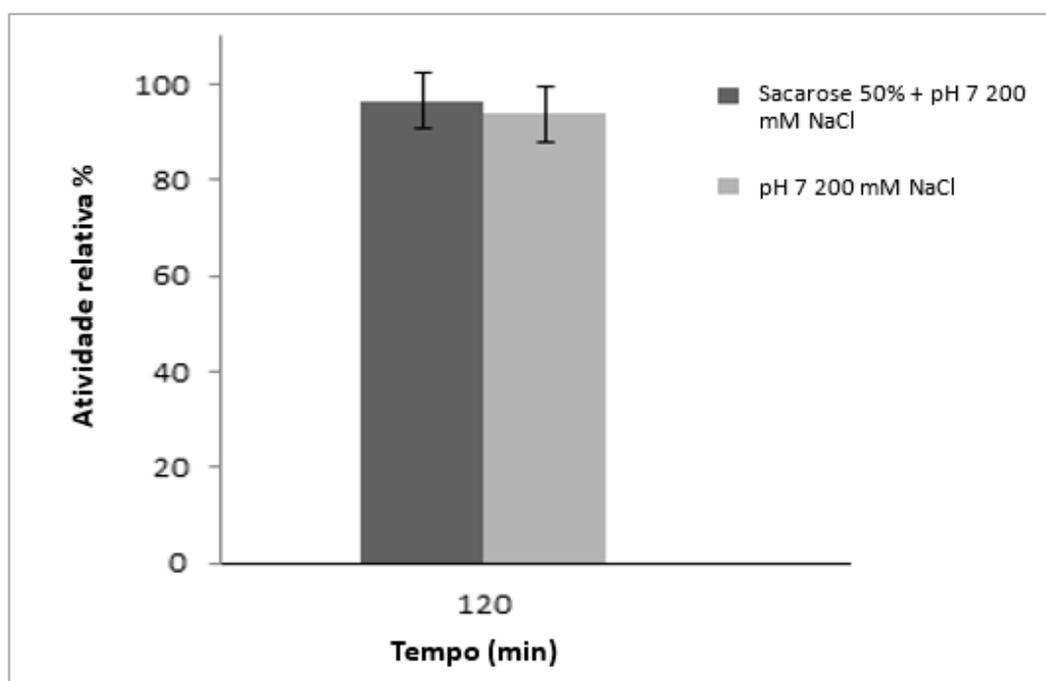


Figura 3.7. Atividade relativa (%) da PlyPI23 após contato com 50 % sacarose e posterior incorporação na solução tampão pH 7 200 mM NaCl. A atividade relativa de referência (100 %) correspondeu a 60 % de atividade lítica (figura A7.5 Anexo VII).

Nos primeiros dias de vida as larvas flutuam em geleia real, da qual se alimentam, e por isso, o efeito desta substância sobre a atividade da PlyPI23 é de grande interesse. O ensaio em que se monitorizou a variação da DO_{620nm} permitiu observar que a atividade antimicrobiana da endolisina aumentou quando esta foi suplementada com geleia real (figura 3.8.).

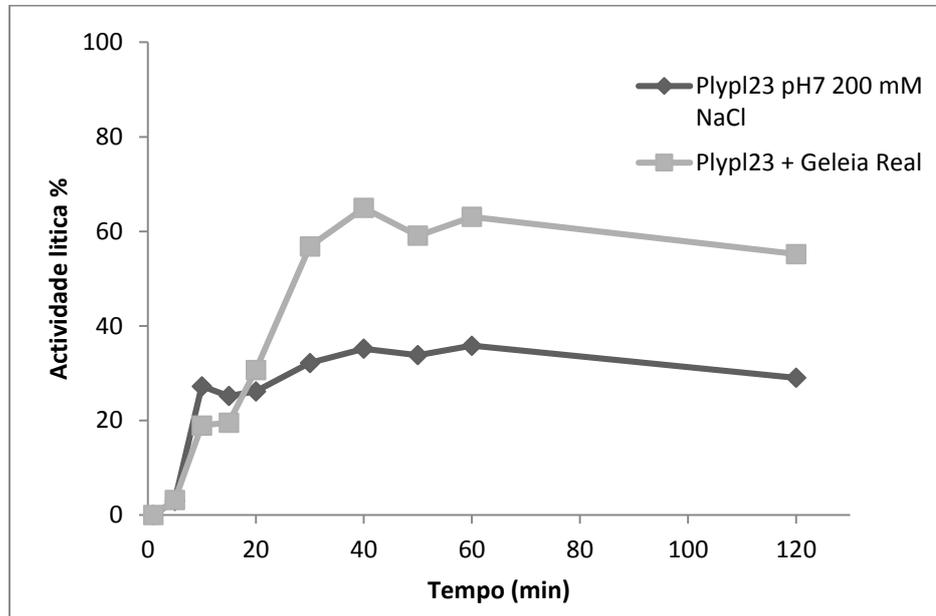


Figura 3.8. Atividade antimicrobiana da PlyPI23 em Tris pH7, 200mM NaCl, comparativamente com Tris pH7 200 mM NaCl + Geleia real, ao longo de 120 min e monitorizada por variação da DO_{620nm} .

Para validar os resultados obtidos por variação da DO_{620nm} foram realizados ensaios por monitorização da variação da concentração em $CFU.ml^{-1}$. Os resultados mostraram que quando em contato com a geleia real, para além de não ser inativada, a endolisina atua de forma mais rápida e mais eficazmente em comparação com pH7, 200 mM NaCl. Nos primeiros 60 min a atividade da enzima a pH7, 200 mM NaCl é semelhante à atividade da geleia real sem enzima, sendo superior a esta no tempo 120 min ($p\text{-value} < 0.01$), demonstrando que a própria geleia real possui atividade antimicrobiana (Tabela 3.4.). Para além disso os resultados revelaram um efeito antimicrobiano sinérgico entre PlyPI23 e a geleia real, aos 30 min de reação, em que a combinação das duas substâncias apresenta uma atividade superior à soma da atividade obtida individualmente (8.9 % PlyPI23 + 7.9 % geleia real < 72.8 % PlyPI23 + geleia real). O mesmo acontece aos 60 min de reação, em que a combinação da PlyPI23 com a geleia real obteve 75.9 % de atividade, sendo esta maior que a soma da atividade obtida para a endolisina e a geleia real separadamente (13.5 % e 18.4 % respetivamente). Após 120m min reação verificou-se um efeito aditivo, em que a soma das atividades individualmente é aproximadamente igual ao efeito antimicrobiano da combinação

PlyPI23 e geleia real (15.0 % PlyPI23+ 55.6 % geleia real \approx 75.6 % PlyPI23 + geleia real). A combinação PlyPI23 com a geleia real permitiu diminuir mais rapidamente a concentração celular, uma vez que a atividade registada de 30 min com os agentes antimicrobianos combinados foi similar à obtida após 120 min, com o efeito das mesmas substâncias, individualmente (p-value > 0.05).

Tabela 3.4. Atividade antimicrobiana da PlyPI23 em Tris pH7, 200 mM NaCl em comparação com Tris pH7, 200 mM NaCl após incubação em geleia real (30 min) e com a atividade antimicrobiana da própria geleia real. Ensaio realizado ao longo de 120 min, e por variação da concentração em CFU.ml⁻¹, a partir de uma concentração inicial de bactéria 10⁷ CFU.ml⁻¹.

Tempo (min)	PlyPI23 pH7 200 mM NaCl	Geleia Real	PlyPI23+ Geleia Real
0	0.00 ±0,00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00
30	8.93 ±4.87	7.92 ±2.29	72.82 ±8.23
60	13.46 ±7.08	18.44 ±4.70	75.86 ±10.24
120	14.99 ±5.39	55.57 ±6.21	75.57 ±16.84

O efeito do homogeneizado de larva (HL) (resultante da maceração das larvas recolhidas) na atividade da PlyPI23 foi outra das condições testadas (por avaliação da variação da concentração em CFU.ml⁻¹). Tal como a geleia real, o HL1 e HL2 também apresentou um efeito antimicrobiano, aos 15 minutos de reação, o HL1 sem enzima apresentou uma redução de 0.35 log de bactéria, e o HL2 de 0.42 log. No final da reação (60 min) o HL1 evidenciou maior efeito antimicrobiano que o HL2, com uma redução de 3.5 log de bactéria atingindo o limite de deteção de 100 CFU/ml, enquanto que o HL2 reduziu a concentração de bactéria em 2.5 log. A adição de PlyPI23 ao HL1 e HL2 apresentou uma redução 3.5 log de bactéria em apenas 15 minutos de reação. Nesta condição o HL1 atingiu o limite de deteção de 100 CFU/ml aos 15 minutos, ao passo que o HL2 obteve o mesmo resultado apenas aos 60 min de reação. A atividade da enzima em HL1 e HL2, é mais rápida (redução de 1log aos 15 min) em comparação com enzima em pH 7, 200mM NaCl (Figura 3.9 e 3.10).

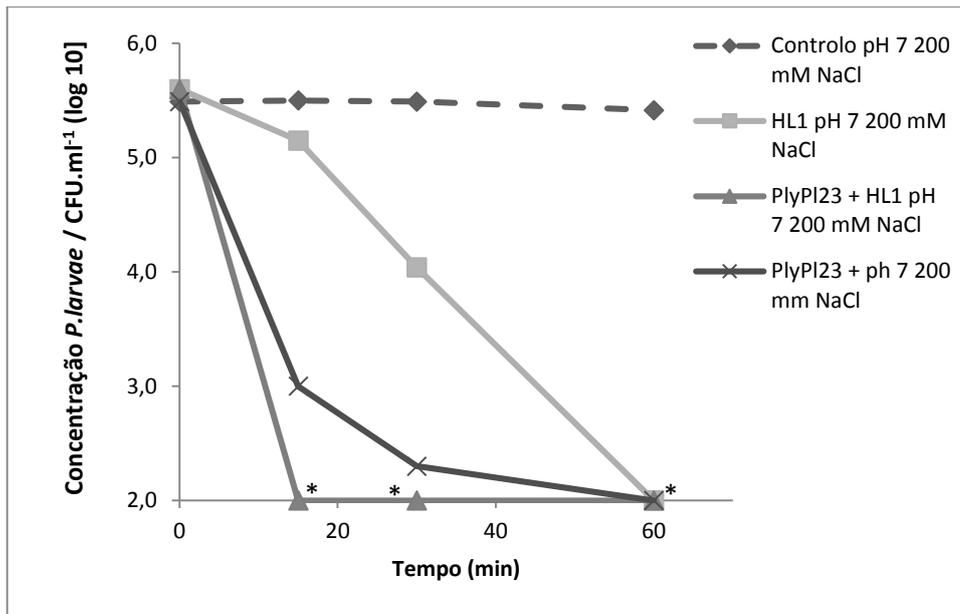


Figura 3.9. Atividade antimicrobiana da PlyPI23 em Tris pH7, 200 mM NaCl em comparação com a PlyPI23 em HL1 e com do próprio HL1. Ensaio realizado ao longo de 120 min, e por variação da concentração em CFU.ml⁻¹. *limite de deteção 100 CFU/ml.

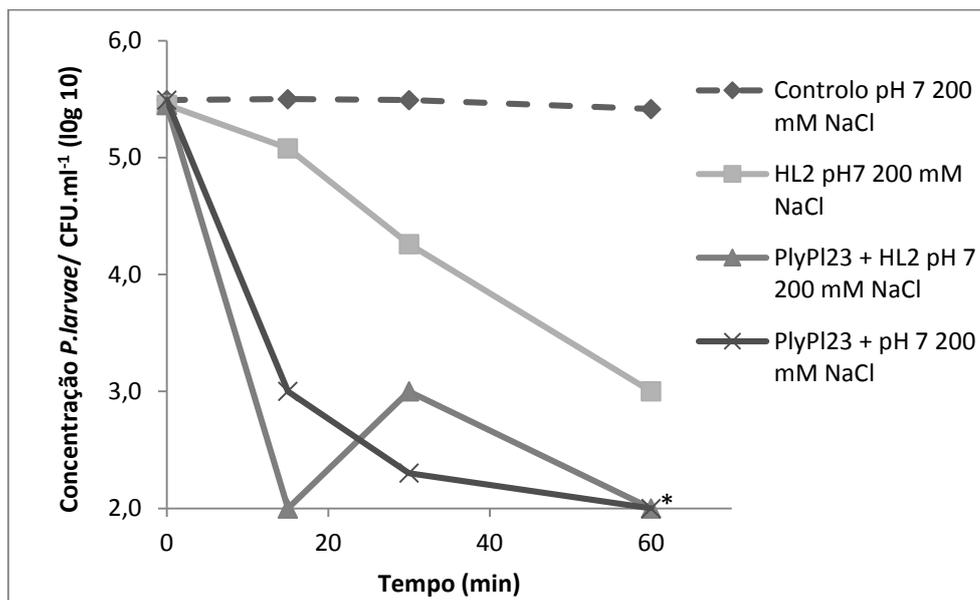


Figura 3.10. Atividade antimicrobiana da PlyPI23 em Tris pH7, 200 mM NaCl em comparação com a PlyPI23 em HL2 e com do próprio HL2. Ensaio realizado ao longo de 120 min, e por variação da concentração em CFU.ml⁻¹. *limite de deteção 100 CFU/ml.

Verificou-se ainda que a ação da endolisina ao fim de seis horas, em contato com a solução Tris pH7 200 mM NaCl, 50 % sacarose, 1:1 (m/v) geleia real, (exposição a condições que pretendiam simular o ambiente a que estará sujeita *in vivo*), também não sofreu alterações, quando comparada com os testes realizados no tampão pH 7, 200 mM NaCl (Figura 3.11.).

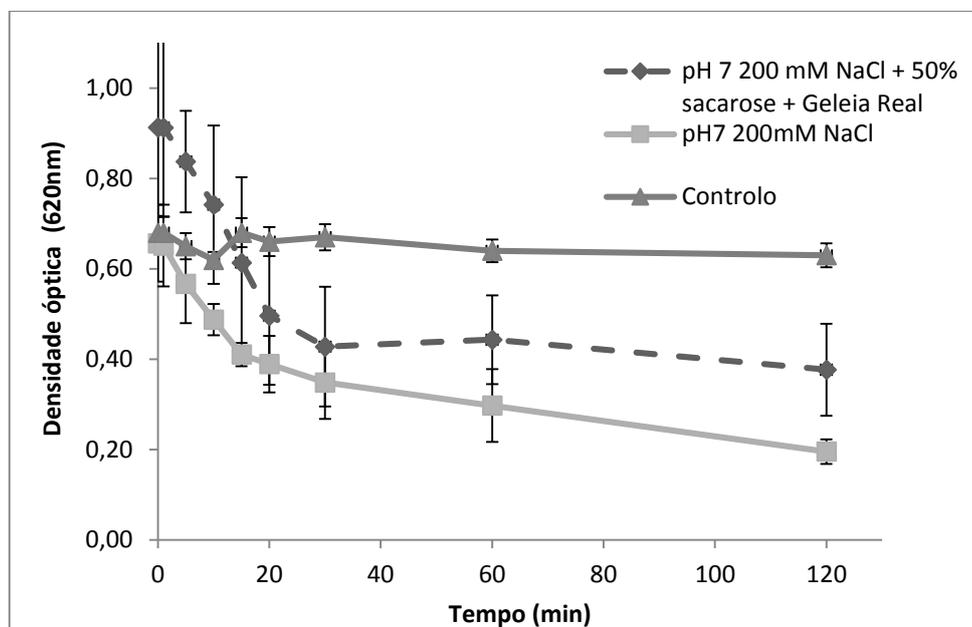


Figura 3.11. Ação da PlyPI23 ao fim de seis horas a 37 °C em contato com uma solução de pH 7 200 mM NaCl com 50 % de sacarose e geleia real 1:1 (m/v) em comparação com a ação da PlyPI23 em pH 7 200 mM NaCl. Resultados obtidos por monitorização da DO_{620nm} .

3.4.3.7. Concentração inicial de bactéria e concentração de PlyPI23

Neste ensaio avaliou-se o efeito de duas concentrações diferentes de endolisina, 2.0 e 0.2 μM , na redução de *P. larvae*, com concentrações iniciais de 10^4 , 10^5 , 10^6 CFU.ml⁻¹. O limite de deteção do método para o tempo 30 e 60 min foi de 100 CFU/ml, enquanto aos 120 min foi de 10 CFU/ml.

Os resultados mostraram que, para cada concentração inicial de bactéria testada, não houve diferenças significativas na atividade lítica da enzima (p-value > 0.05) independentemente da concentração de proteína usada (figura 3.12; 3.13; 3.14).

Para uma concentração inicial de bactéria de 10^4 CFU.ml⁻¹, aos 30 min já não foi possível verificar crescimento bacteriano (<100 CFU/ml). Com o aumento da concentração de bactérias para 10^5 CFU.ml⁻¹, apenas aos 60 min se verificou a ausência de crescimento bacteriano (<100 CFU/ml), onde aos 120 min, verificou-se uma redução de 3.9 log.

Para uma concentração de 10^6 CFU.ml⁻¹, não foi possível em 120 min observar a ausência de crescimento bacteriano (< 10 CFU/ml). Ao final deste período, obteve-se uma redução de 3.8 log.

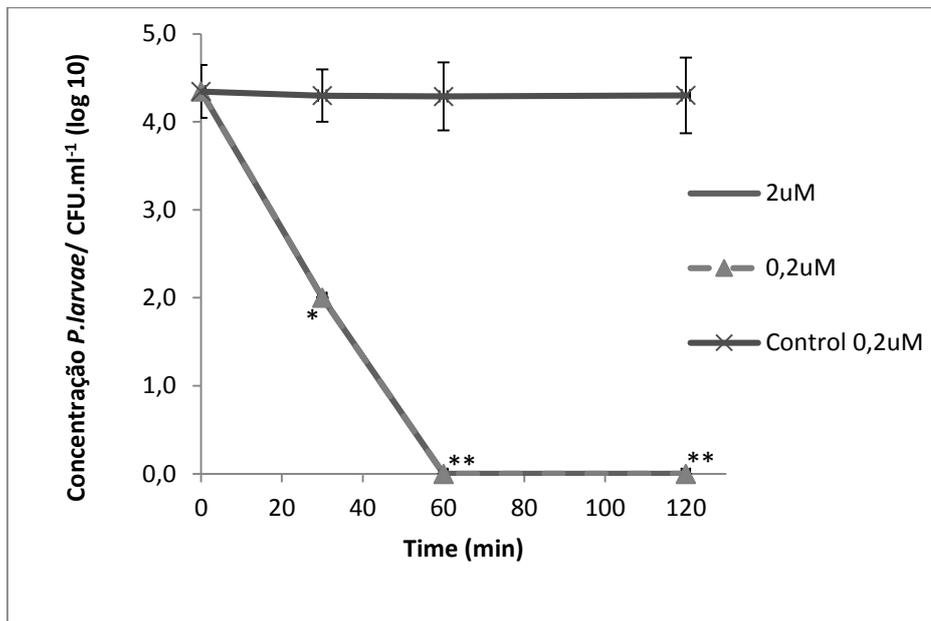


Figura 3.12. Variação da concentração celular ao longo do tempo, usando uma concentração inicial de bactéria de 10^4 CFU.ml⁻¹ após adição de 2.0 e 0.2 μ M de endolisina. *limite de detecção 100 CFU/ml; **limite de detecção 10 CFU/ml.

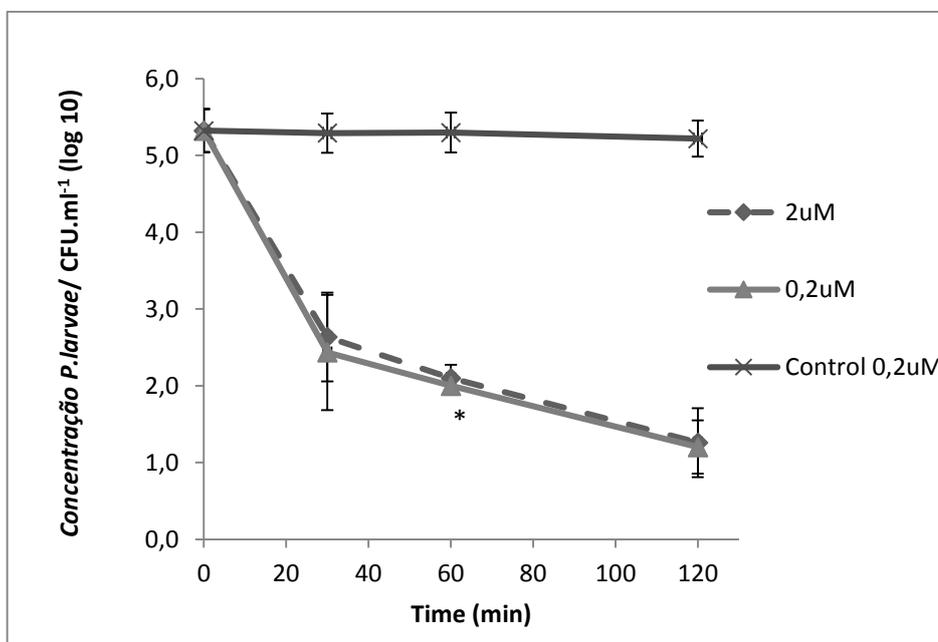


Figura 3.13. Variação da concentração celular ao longo do tempo, usando uma concentração inicial de bactéria de 10^5 CFU.ml⁻¹ após com adição de 2.0 e 0.2 μ M de endolisina.*limite de detecção 100 CFU/ml.

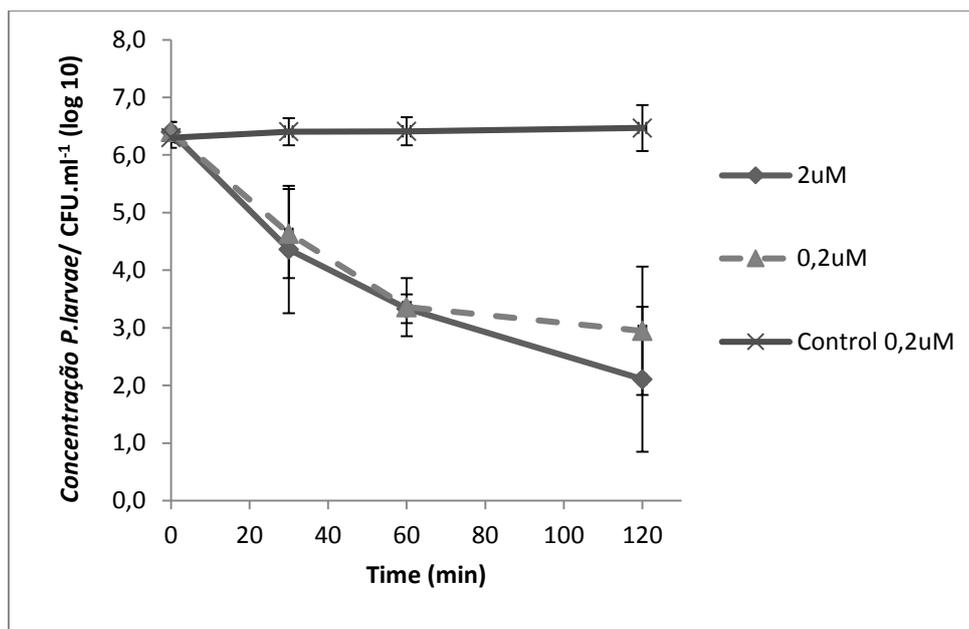


Figura 3.14. Variação da concentração celular ao longo do tempo, usando uma concentração inicial de bactéria de 10^6 CFU.ml⁻¹ após com adição de 2.0 e 0.2 μ M de endolisina.

Discussão

4. DISCUSSÃO

A loque americana é a doença bacteriana das abelhas mais grave em todo o mundo, e é provocada pela bactéria *Paenibacillus larvae* (Govan *et al.*, 1999). Neste estudo, o isolamento de novas estirpes de *P. larvae* foi efetuado a partir de amostras recolhidas em apiários portugueses com sintomas da doença, e a confirmação da espécie foi feito com base no gene de ARN ribossomal 16s. Das amostras recolhidas, 50 % foram identificadas como *P. larvae*. As restantes amostras, negativas para esta bactéria mas positivas para outras formadoras de esporos, provavelmente correspondiam a outros microrganismos formados de esporos, encontrados no ambiente da colmeia e nos próprios produtos apícolas, como é o caso de *Bacillus spp* (nomeadamente *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus*), *Clostridium botulinum*, *Paenibacillus alvei*, *Paenibacillus apiarius* (Gilliam, 1979; Gilliam and Prest, 1987; Snowdon and Cliver, 1996).

A estirpe hospedeira do fago philBB_PI23, H23, usada para os testes com a endolisina PlyPI23, pertence ao genótipo ERIC I, detetado em 76 % das amostras isoladas de *P. larvae*. Este é menos virulento do que o ERIC II, genótipo ao qual pertencem as restantes estirpes analisadas (Generesch *et al.*, 2010). De acordo com Generesch *et al.*, 2010, estes são os únicos dois genótipos identificados no continente Europeu (o ERIC I foi identificado também nos Estados Unidos), uma vez que os genótipos ERIC III E IV não têm sido isolados nos últimos anos.

As amostras utilizadas para o isolamento de bacteriófagos, solo e efluente das redondezas de apiários, não permitiram a obtenção de novos fagos por nenhuma das metodologias utilizadas. No entanto estes métodos baseados no pré-enriquecimento das amostras têm sido usados com sucesso no isolamento de fagos (Twest e Kropinski, 2009).

Com o isolamento de novos bacteriófagos pretendia-se, através da análise do seu genoma, identificar outras potenciais endolisinas (Loessener *et al.*, 2005). Até ao momento, seis fagos de *P. larvae* foram isolados e sequenciados, dos quais cinco pertencem à família *Myoviridae* e um à família *Siphoviridae* (Merril *et al.*, 2014). O fago *Siphoviridae* é o philBB_PI23 (Oliveira *et al.*, 2013), muito diferente dos outros cinco fagos, possuindo um genoma mais pequeno com um menor número de genes. Uma vez que não foi possível isolar mais fagos para este trabalho, recorreu-se à análise bioinformática do genoma do fago philBB_PI23 (Oliveira *et al.*, 2013) para expressar a sua endolisina. Esta análise levou à identificação uma sequência nucleotídica, na CDS21, que codifica, uma lisina de conformação modular (com o domínio catalítico na região N-terminal e um domínio de ligação na região C-terminal). Ao contrário do domínio catalítico, o domínio de ligação, não revelou

identidade com qualquer sequência aminoacídica do GenBank (4SNZZ4UZ014), sugerindo a possível existência de um novo domínio de ligação. A caracterização deste domínio será importante, não só para avaliar o grau de especificidade que confere à endolisina, mas também verificar se este é essencial na atividade da mesma. Para além disso a caracterização irá permitir verificar se este domínio possui alguma função que o diferencie dos demais, ou ainda verificar o seu potencial uso para outras aplicações, como por exemplo, biomarcador para identificação da *P. larvae* e/ou deteção da doença.

O domínio catalítico é uma *N*-acetylmuramoyl-*L*-alanina amidase, que catalisa uma reação química, esta cliva a ligação amida entre os resíduos de *N*-acetylmuramoyl e os resíduos de *L*-alanina, em glicopéptidos da parede celular.

Esta endolisina, à qual se deu o nome de PlyPI23 foi expressada, purificada e caracterizada. Apesar da análise do gel de SDS-PAGE indicar que não existiam diferenças entre a eficiência da expressão da proteína a 16 °C e a 30 °C, mostrando uma única banda, de igual tamanho e intensidade em ambas as condições, a solubilidade da enzima não demonstrou a mesma tendência. A expressão a 16 °C permitiu a obtenção da enzima num estado completamente solúvel, ao contrário da expressão a 30 °C onde se observou a formação de precipitado. Este fenómeno pode ter resultado de um incorreto enovelamento (*fold*ing) das proteínas, que tem maior probabilidade de acontecer a 30 °C do que a 16 °C, já que a temperaturas de incubação mais baixas, este processo é mais lento, resultando num aumento da solubilidade e estabilidade. Existem vários trabalhos em que a temperatura mais favorável para a indução da expressão de proteínas recombinantes solúveis se situa entre 15 e 25 °C (Sørensen and Mortensen, 2005; Gräslund1 *et al.*, 2008).

No processo de concentração e troca do tampão de armazenamento da PlyPI23, dois métodos foram testados: a dialise e a ultracentrifugação. Ao contrário da ultracentrifugação, em que se verificou um aumento da concentração da proteína após o processo (em média, 153 %), a diálise não foi considerada eficiente, por se ter verificado 67 % de perda de endolisina. No entanto este último método de concentração foi já reportado como eficiente por outros autores, como Turck e Bierbaum, (2012), Walmagh *et al.*, (2012), Yuan *et al.*, (2012).

O armazenamento da endolisina a -20 °C mostrou-se a melhor opção relativamente às outras temperaturas testadas (temperatura ambiente, 4 °C, -80 °C), não alterando a atividade da enzima, no mínimo durante 16 semanas. Este resultado foi reportado já noutros trabalhos, de Turck e Bierbaum (2012) em que uma proteína de *Staphylococcus aureus* guardada a -20 °C durante 1 ano

não perdeu atividade. A liofilização como método de conservação revelou-se também uma boa opção, pois a enzima manteve-se ativa após a reidratação da mesma. Os ensaios de atividade da PlyPI23 ocorreram a 37 °C, temperatura similar à encontrada na colmeia (cerca de 34 a 35 °C) com valores de pH de atividade ótimo entre 3 e 4, que corresponde aos valores de pH do mel, pólen, geleia real ou néctar. Consequentemente, o contato provável da endolisina com estas substâncias ácidas presentes na colmeia não afetará a sua atividade. Este resultado mostrou que, para uma aplicação prática, a endolisina deverá ser mais resistente do que os fagos, uma vez que no âmbito de outros trabalhos do grupo se verificou que outros fagos de *P. larvae*, incluindo o phiIBB_PI23, não permaneceram estáveis a pH baixo (3 e 4). Para valores de pH entre 5 e 7, que correspondem aos encontrados no trato intestinal de abelhas adultas (5.6 a 6.3) e larvas de abelhas (6.8) (Alvarado *et al.*, 2013), apesar de mais baixa, a atividade foi satisfatória. A adição de 200 mM NaCl melhorou a atividade antimicrobiana para o pH 7, relativamente às concentrações de 0 e 50 mM NaCl. Um resultado semelhante foi obtido para uma endolisina proveniente de *Bacillus cereus* com a adição de 250 mM de NaCl (Park *et al.*, 2012) e para uma endolisina de *Listeria* com a adição de 200 e 300 mM NaCl (Schmelcher *et al.*, 2012a).

Num outro ensaio, observou-se que, apesar da análise bioinformática da proteína ter mostrado que, tal como outras *N*-acetylmuramoyl-*L*-alanine amidases, esta enzima possuía resíduos de ligação ao zinco, o efeito deste íão (0.1 mM) não melhorou a sua atividade, mostrando que este não tem influência na sua ação antimicrobiana. Resultados semelhantes foram obtidos com outras endolisinas (amidases) derivadas de fagos de *B. Cereus* e *E. Faecalis* (Uchiyoma *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2012). Por outro lado uma endolisina *L*-alanoyl-*D*-glutamate endopeptidase derivada de fago de *Bacillus cereus* com resíduos de ligação ao zinco revelou ser dependente deste íão (Son *et al.*, 2012). O principal objetivo deste ensaio foi avaliar o seu efeito na ação da endolisina, visto numa situação de campo a aplicação de uma solução com zinco não ser adequada. No entanto para avaliar mais corretamente o papel deste íão na atividade da endolisina ou mesmo verificar se este pode funcionar como repressor seria importante, para além de alargar a gama de zinco a ser testada, remover qualquer resíduo do íão que pudesse estar no meio de reação (usando EDTA).

A análise do espectro lítico da PlyPI23 revelou que esta possui um amplo espectro de ação (100 % das estirpes de *P. larvae* testadas foram sensíveis), e superior ao do fago donde derivou, o phiIBB_PI23, que atuou em apenas sobre 76.2 % dessas estirpes. Resultados idênticos foram obtidos com outras endolisinas, que apresentaram um espectro lítico mais amplo em comparação com os respetivos fagos hospedeiros (Schmelcher *et al.*, 2012b). Este facto poderá estar relacionado com o facto do

peptidoglicano da parede celular (alvo de degradação pela enzima), ser mais conservado entre as estirpes que foram testadas do que os recetores da parede celular que o fago reconhece para se ligar.

A elevada atividade pode dever-se também ao facto das amidases geralmente exibirem um espectro mais abrangente de atividade antibacteriana em relação a outras classes de endolisinas pela ocorrência muito frequente da ligação amida entre N-acetylmuramic e a L-alanine na parede do peptidoglicano (Gerova *et al.*, 2011).

A confirmação de que o aglomerado celular que ocorreu após a ação da enzima a pH 3 correspondia a células mortas e não apenas agregadas, foi obtida não só através da observação do decréscimo de $D.O_{620nm}$ após homogeneização do precipitado, mas também pelo método sugerido por Boll (2013), através da medição da absorvância proteica pelo método BCA. Com este último método, ao fim de 120 min verificou-se um aumento da $D.O_{562nm}$ de 0.326, no sobrenadante celular após reação. De acordo com Boll, (2013), um resultado superior a 0.07 indica um aumento na quantidade de proteínas no meio de reação, que corresponde a proteína que saiu do interior da bactéria após morte celular.

A PlyPI23 mostrou não ser ativa contra bactérias Gram-positivas do género *Bacillus* e *Lactobacillus* que pertencem ao mesmo grupo do peptidoglicano que *P. larvae* (Grupo A), A1 e A4 respetivamente (Scheleifer e Kandler, 1972). Com a exceção da estirpe *Bacillus coagulans*, a PlyPI23 mostrou ser inativa para todas as estirpes testadas nomeadamente: *Bacillus Cereus*, *Bacillus subtilis subsp subtilis*, *B.thuringiensis*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus Lactis*, *Lactobacillus paracasei*. Este resultado não afeta a aplicação da endolisina nas larvas pois a bactéria *Bacillus coagulans* não é comensal das larvas de abelhas nos primeiros estágios larvares (Vojvodic *et al.*,2013). No entanto mais estudos para auferir a especificidade da PlyPI23 terão que ser efetuados, nomeadamente em bactérias comensais presentes nos intestinos das larvas como e o caso da *Lactobacillus. Kunkeei* ou das *Acetobacteraceae*, que conferem proteção contra patogénicos (Vojvodic *et al.*,2013; Maddaloni *et al.*, 2014).

Para a aplicação da PlyPI23 no local de infeção da bactéria *P. larvae* (intestino das larvas) é necessário que as larvas das abelhas se alimentem desta, e para tal, pensou-se em incorporar a endolisina na alimentação das larvas. O pólen é a principal fonte de alimentação das abelhas e nos períodos de escassez deste alimento nomeadamente no inverno é necessário fornecer às abelhas novas fontes de alimentos. Como tal são usadas reservas de mel ou fontes artificiais de açúcar

nomeadamente a sacarose (normalmente 50 %), incorporada na água bebida pelas abelhas (Waller, 1972; Nicolson and Human, 2008). Testou-se portanto a viabilidade da aplicação da endolisina nestas soluções e, verificou-se que a sua inoculação em 50 % sacarose não afetou a atividade, o que viabiliza a sua aplicação prática. Por outro lado quando em contacto com o mel a endolisina perdeu atividade (dados não mostrados) e por isso esta solução não é indicada para a aplicação da PlyPI23.

Assim duas estratégias de administração da endolisina em larvas infetadas com *P. larvae* foram projetadas: a incorporação da endolisina numa solução de sacarose (50 %) fornecida a abelhas adultas, que posteriormente irão alimentar as larvas e/ou a pulverização diretamente para os favos que contêm larvas.

A viabilidade da segunda via de administração sugerida, o *spray* das larvas, foi comprovada quando se verificou que a endolisina não só não era inativada pela geleia real, como a sua ação era potenciada pelo contato com esta substância. A geleia real está presente nos alvéolos das larvas onde estas flutuam desde a eclosão dos ovos até fases larvares precoces (até 2 a 3 dias de idade), e da qual se alimentam durante esse tempo (Martos *et al.*, 2008; Gatschenbrger *et al.*, 2013; Crailsheim *et al.*, 2013). É produzida nas glândulas da hipofaringe das abelhas adultas e é composta por água, proteínas, hidratos de carbono, lípidos, sais minerais, vitaminas e enzimas, nomeadamente proteases que poderiam ter algum efeito nocivo sobre a endolisina (Martos *et al.*, 2008). Os ensaios efetuados após contato da PlyPI23 com a geleia real mostraram um efeito antimicrobiano sinérgico entre estas duas substâncias, logo aos 30 min de reação, (a atividade da combinação dos dois agentes antimicrobianos foi de 70 %, superior à de cada um individualmente) sugerindo que há vantagens em termos de eficiência antimicrobiana em juntar estas duas substâncias numa aplicação prática. Vários estudos demonstraram a atividade antimicrobiana da geleia real e de alguns dos seus componentes separadamente, como é o caso do ácido 10-hydroxy-2-decenoic e da roialisina em bactérias gram-positivas, entre as quais a *P. larvae* (Bilikova *et al.*, 2001; Martos *et al.*, 2008), no entanto nenhuma tinha ainda comparado este efeito com o efeito da sua associação a uma endolisina. Algumas das explicações prováveis para o efeito sinérgico poderá ser a presença de componentes na geleia real que estejam a atuar como cofatores, como é o caso das vitaminas e o facto da geleia real poder estar a sensibilizar a parede celular das bactérias, permitindo a ação mais fácil e mais rápida da enzima.

A tolerância e sobrevivência da PlyPI23 no intestino das larvas é importante para a viabilidade da aplicação *in vivo* desta enzima, visto ser este o local onde irá atuar. Por essa razão, o comportamento da ação da endolisina em homogeneizado de larva (HL) foi testado. Em apenas 15 minutos observou-se uma redução de 3.5 log de bactéria quando a enzima atuou em HL1 e HL2, redução que só se verificou com a enzima em pH 7, 200 mM NaCl, (para a mesma concentração inicial de bactéria (10^5 CFU.ml⁻¹) aos 60 min de reação. Este resultado demonstrou que, para além do HL não inibir a ação da enzima, ainda potencia o seu efeito. Foram verificadas diferenças entre a ação de HL1 e HL2 sem enzima aos 60 min de reação, tendo-se verificado uma redução de 3.5 log de bactéria com o HL1 e de 2.5 log com o HL2. O maior efeito antimicrobiano de HL1 (estado larvar 1 e 2) em relação a HL2 (estado larvar 3 e 4) é contraditório à informação reportada na literatura, que sugere que larvas mais velhas possuem mais resistência à *P. larvae*, devido à presença no trato intestinal de péptidos antimicrobianos e de bactérias comensais que inibem o crescimento da *P. larvae*, como é o caso dos *Lactobacillus* (Yue *et al.*, 2008; Vojvodic *et al.*, 2013).

A avaliação da resistência da endolisina a condições que se aproximem das de uma aplicação no campo foi ainda efetuada através da incubação da enzima, a 37 °C durante 6 h, numa solução com 50 % sacarose, 1:1 (m/v) de geleia real, e 200 mM NaCl, a pH7, após o qual permaneceu ativa sem perdas de atividade.

A ação antimicrobiana da enzima, a concentrações de 0.2 e 2.0 µM foi demonstrada através da diminuição da concentração bacteriana em cerca de 4 log, independentemente da concentração de enzima que se usou e da concentração inicial de bactéria usada (10^4 , 10^5 ou 10^6 CFU.ml⁻¹). A concentração 0.2 µM de PlyPI23 (aos 120 min de reação) foi capaz de reduzir uma população de bacteriana de *P. larvae* de 10^4 CFU.ml⁻¹ para níveis não detetáveis (<10 CFU.ml⁻¹). Resultados anteriores mostram que 5×10^3 CFU.ml⁻¹ de *P. larvae* é suficiente para causar a morte de cerca de 70 % das larvas infetadas (Lindstrom *et al.*, 2008; Forsgreen *et al.*, 2009). Deste modo, os resultados *in vitro* mostram que PlyPI23 é eficiente no controlo de concentrações bacterianas de *P. larvae* normalmente encontradas em colmeias infetadas.

Como já mencionado LA é uma das doenças bacteriana mais devastadoras na apicultura causando graves prejuízos económicos. Tendo em vista o combate desta doença, os resultados deste trabalho foram encorajadores e propõem uma aplicação *in vivo* viável da endolisina. Esta solução apresenta por isso potencial para um aumento da rentabilidade do setor apícola diminuindo os prejuízos, além de resolver a problemática do impedimento da comercialização de mel e outros produtos com resíduos de antibióticos.

Conclusão

5. CONCLUSÃO

A PlyPI23 é a primeira endolisina derivada de um fago de *P. larvae* que foi expressa e caracterizada. É uma *N*-acetylmuramoyl-*L*-alanina amidase com um domínio catalítico e um domínio de ligação à parede celular, solúvel quando expressa a 16 °C e estável à temperatura de armazenamento de -20°C.

Apresenta alta atividade a valores de pH baixos nomeadamente a pH 3 e 4, níveis de pH encontrados em diversos produtos apícolas. Quanto suplementado com 200 mM NaCl a pH 7, semelhante ao pH encontrado em larvas e abelhas adultas, apresenta igualmente resultados de atividade antimicrobiana muito elevados. Com apenas 0.2 µM de PlyPI23 é possível a redução de 4 log na concentração de *P. larvae*, suficiente para destruir concentrações de bactéria encontradas nas larvas infetadas.

Para além disso, a PlyPI23 possui um amplo espetro de ação e resiste às condições ambientais da colmeia, apresentando ainda um aumento de atividade quando em contato com geleia real e homogeneizado de larva.

Deste modo os resultados *in vitro* indicam um elevado potencial de PlyPI23 para integrar um produto comercial para o controlo da loque americana.

Perspetivas Futuras

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Apesar dos resultados *in vitro* serem promissores, mais estudos devem ser realizados para uma caracterização mais aprofundada da endolisina PlyPI23. Novas estirpes de *P. larvae* devem ser isoladas de forma a aumentar a diversidade da coleção e tornar o espectro lítico mais significativo. Para além disso pretende-se perceber com mais exatidão qual o genótipo de *P. larvae* prevalecente em Portugal, e se está de acordo com os resultados encontrados no resto da Europa.

O facto da análise bioinformática, ter revelado que a PlyPI23 possivelmente possui um novo domínio de ligação, torna importante caracterizar este domínio e verificar se é essencial e/ou benéfico para a ação da enzima como agente antimicrobiano. Por disso, após a caracterização, a remoção do domínio de ligação da estrutura da endolisina deve ser feita de modo a verificar se há uma maior atividade da endolisina, ou se pelo contrário a ação do domínio catalítico fica comprometida.

Por fim a eficiência da PlyPI23 deverá ser confirmada através de ensaios *in vivo*, numa primeira fase em larvas criadas em laboratório, e posteriormente em estudos de campo, que incluem a avaliação da frequência de aplicação da PlyPI23 às larvas.

Referências Bibliográficas

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams. M. H., 1959. Antigenic proprieties. Bacteriophages. Interscience Publishers, 97-119pp.
- Alippi. A. M., 2000. Is terramycin Riosingn its effectiveness against AFB ?. Bee Biz, 11, 27-29pp.
- Alippi. A. M., López. A. C., Aguilar O. M., 2002. Differentiation of *Paenibacillus larvae* subsp. larvae, the Cause of American Foulbrood of Honeybees, by Using PCR and Restriction Fragment Analysis of Genes Encoding 16S rRNA. Applied and environmental microbiology, 68, 7, 3655–3660 pp.
- Alvarado. I., Phui. A., Elekonich. M. M., Abel-Santosb. E., 2013. Requirements for In Vitro Germination of *Paenibacillus larvae* Spores. Journal of Bacteriology, 195, 5, 1005–1011pp.
- Antúnez K., Piccini. C., Sowinski. C. S., Rosado. A.S., Seldin. L., Zunino. P., 2007. Phenotypic and genotypic characterization of *Paenibacillus larvae* isolates. Veterinary Microbiology, 124, 178–183pp.
- Antúnez, K., Anido, A., Schapp, G., Evans, J. D., Zunino, P., 2009.Characterization of secreted proteases of *Paenibacillus larvae*, potential virulence factors involved in honeybee larval infection. Journal of Invertebrate Pathology, 102, 129-132pp.
- Antunez. K., Harriet. J., Gende. L., Maggi. M., Eguaras. M., Zunino. P., 2008. Efficacy of natural propolis extract in the control of American Foulbrood. Veterinary Microbiology, 131, 324–331pp.
- Arbia. A., Babbay. B., 2011. Management Strategies of honey Diseases. Journal of Entomology, 8, 1, 1-15pp.
- Bakonyi, T., Derakhshifar, I., Grabensteiner, E., Nowotny, N., 2003. Development and evaluation of PCR assays for the detection of *Paenibacillus larvae* in honey samples: comparison with isolation and biochemical characterization. Applied and Environmental Microbiology, 69, 3, 1504.1510 pp.
- Bastos E. M. A.F., Simone, M., Jorge. D. M., Soares. A. E. E., Spivak. M., 2008. In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against *Paenibacillus larvae*. Journal of Invertebrate Pathology, 97, 273–281pp.

- Bíliková. K., wub. G., Limútha. J. S., 2001. Isolation of a peptide fraction from honeybee royal jelly as a potential antifoulbrood factor. *Apidologie*, 32, 275–283pp.
- Boll. K., 2013. Klonierung und Charakterisierung eines Phagenlysins und sein Einsatz zur diagnostischen Erkennung von *Bacillus anthracis* zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet. beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, 179 pp.
- Chan. B.K., Abedon. S.T., Loc-Carrillo. C., 2013. Phage Cocktails and the Future of Phage Therapy. *Future Microbiol.*, 8, 6, 769-783pp.
- Cheng. Q., Nelson. D., Zhu. S., Fischetti. V. A., 2005. Removal of Group B Streptococci Colonizing the Vagina and Oropharynx of Mice with a Bacteriophage Lytic Enzyme. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49, 1, 111–117pp.
- Crailsheim. K., Brodschneider. R., Aupinel. P., Behrens, D., Genersch. E., Vollmann. J., Riessberger-Gallé. U., 2013. Standard methods for artificial rearing of *Apis mellifera* larvae. *J. Apic. Res.* 52.
- Dancer. B. N., 1 and Chantawannakul. P., 1997. The Proteases of American Foulbrood Scales. *Journal of invertebrate pathology*, 70, 79–87 pp.
- Deresinski, S., 2009. Bacteriophage Therapy: Exploiting Smaller Fleas. *Clinical Infectious Diseases*, 48, 1096 –1101 pp.
- Direcção geral Alimentação e veterinária, 2014. Programa Sanitário Apícola 2014 URL: <http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV>, consultado 04-06-14.
- Djukic. M., Brzuszkiewicz. E., Funfhaus. A. Voss. J., Gollnow. K., Poppinga. L., Liesegang. H., Garcia-Gonzalez. E., Genersch. E., Daniel R., 2014. How to Kill the Honey Bee Larva: Genomic Potential and Virulence Mechanisms of *Paenibacillus* larvae. *Plos one*, 9, 3, 1-14pp.
- Dobbelaere, W., de Graaf, D.C., Peeters, J.E., and Jacobs, F.J., 2001. Development of a fast and reliable diagnostic method for American foulbrood disease (*Paenibacillus larvae* subsp. larvae) using a 16S rRNA gene based PCR. *Apidologie* 32, 363–370 pp.
- Endersen. L., O'Mahony. J., Hill. C., Ross. R. P., McAuliffe. O., Coffey. A., 2014. Phage Therapy in the Food Industry. *Annu. Rev. Food Sci. Technol*, 5, 327–49 pp.
- Evans. J. D., and Armstrong. T.N., 2006. Antagonistic interactions between honey bee bacterial symbionts and implications for disease. *BMC Ecology*, 6, 4, 1-9 pp.

- Fischetti. V. A., 2008. Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Current Opinion in Microbiology*, 11, 393–400 pp.
- Fischetti. V. A., 2010. Bacteriophage endolysins: A novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 300, 357–362 pp.
- Forsgren, E., Olofsson, T. C., V´asquez, A., Fries, I., 2009. Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus larvae* in honey bee larvae. *Apidologie*, 41, 99-108.
- Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly. *J. Food Sci.* 73, 117–124pp.
- Gallai. N., Salles. J. M., Josef. S., Vaissière. E. B., 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics*, 68, 8, 10 – 821pp.
- Gatschenberger. H., Azzami. K., Tautz. J., Beier. H., 2013. Antibacterial Immune Competence of Honey Bees (*Apis mellifera*) Is Adapted to Different Life Stages and Environmental Risks. *PLOS ONE*, 8, 6, 1-14 pp.
- Genersch, E., 2009. American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103 S10–S19 pp.
- Genersch, E., Forsgren, E., Pentikainen, J., Ashiralieva, A., Rauch, S., Kilwinski, J., Fries, I., 2006. Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *Larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 501–511 pp.
- Genersch. E., Ashiralieva. A., Fries. I., 2005. Strain- and Genotype-Specific Differences in Virulence of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a Bacterial Pathogen Causing American Foulbrood Disease in Honeybees. *Applied and environmental microbiology*, 7, 11, 7551–7555 pp.
- Gerova. M., Halgasova. N., Ugorcakova. J., Bukovska. G., 2011. Endolysin of bacteriophage BFK20: evidence of a catalytic and a cell wall binding domain. *FEMS Microbiol Lett*, 321, 83–91 pp.
- Gilliam. M., 1979. Microbiology of pollen and bee bread: The genus *Bacillus*. *Apidologie*, 10, 3, 269-279 pp.
- Gilliam. M., and Prest. D. B., 1987. Microbiology of Feces of the Larval Honey Bee, *Apis mellifera*. *Journal of invertebrate pathology*, 49, 70-75 pp.

- González. M.J., and Marioli J.M., 2010. Antibacterial activity of water extracts and essential oils of various aromatic plants against *Paenibacillus* larvae, the causative agent of American Foulbrood. *Journal of Invertebrate Pathology*, 104, 209–213 pp.
- Govan, V. A., Allsopp, M. H., Davison, S., 1999. A PCR Detection Method for Rapid Identification of *Paenibacillus* larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, 5, 65, 2243-2245 pp.
- Graaf, D. C., Alippi, A. N., Antúnez, K., Aronstein, K. A., Budge, G., Koker, D., Smet, L., Dingman, D. W., Evans, J. D., Foster, L. J. Funfhaus, A., Gonzalez, E. G., Gregorc, A., Human, H., Murray, K. D., Nguyen, B. K., Poppinga, L., Spivak, M., Engelsdorp, D., Wilkins, S., Genersch, E., 2013. Standard methods for American foulbrood research. *Journal of Apicultural Research* 52, 1, 1-28 pp.
- Grabow. W., 2001. Bacteriophages: Update on application as models for viruses in water. *Water SA*, 27, 2 251-268 pp.
- Gräslund. S., Nordlund. P., Weigelt. J., Hallberg. B. M., Bray. J., Gileadi. O., Knapp. S., Oppermann. U., Arrowsmith. C., 2008. Protein production and purification. *Nat Methods*. 5, 2, 135–146 pp.
- Grosboillot. V., 2014. Isolation and characterization of bacteriophages active against *P. larvae* for AFB control. Tese de mestrado, Center of Biological Engineering (CEB), Universidade do Minho, 31 pp.
- Heyndrickx, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Kersters, P. J. K., Vos, P., Logan, N. A., Ali, N., Berkekey, R. C. W., 1996. Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash *et al.* 1994, a Later Subjective Synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash *et al.* 1994, as a Subspecies of *P. larvae*, with Emended Descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *Larvae* and *P. larvae* subsp. *Pulvifaciens*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1, 46, 270-279 pp.
- Hodyra. K., and Dabrowska, K., 2014. Molecular and Chemical Engineering of Bacteriophages for Potential Medical Applications. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*
- Housby. J. N., and Mann. N. H., 2009. Phage therapy. *Drug Discovery Today*, 14, 11/12, 536-540 pp.

- Human. H., Brodschneider. R., Dietemann. V., Dively. G., Ellis, J.D., Forsgren. E., Fries. I., Hatjina. F., Hu. F. L., Jaffé. R., *et al.* (2013). Miscellaneous standard methods for *Apis mellifera* research. *Journal of Apicultural Research*, 52, 4, 1–56pp.
- Intralytix safe by nature, 2013. Intralytix Products. URL: http://www.intralytix.com/Intral_products.htm, consulted in 04-12-13.
- Jończyk. E., Kłak. M., Międzybrodzki. R., Górski. A., 2011. The influence of external factors on bacteriophages—review. *Folia Microbiol*, 56, 191–200 pp.
- Kropinski, A. M., 2006. Phage therapy – Everything old is new again. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 5, 17, 297-306 pp.
- Lindström. A., Korpela. S., Fries. I., 2008. The distribution of *Paenibacillus larvae* spores in adult bees and honey and larval mortality, following the addition of American foulbrood diseased brood or spore-contaminated honey in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *J. Invertebr. Pathol.* 99, 82–86 pp.
- Loessner, M.J., 2005. Bacteriophage endolysins—current state of research and applications. *Curr Opin Microbiol* 8, 480-487 pp.
- Loessner. M. J., Maier. S. K., Daubek-puza. H., Wendlinger. G., Scherer. S., 1997. Three *Bacillus cereus* Bacteriophage Endolysins Are Unrelated but Reveal High Homology to Cell Wall Hydrolases from Different Bacilli. *Journal of bacteriology*, 179, 9, 2845–2851 pp.
- Maddaloni. M., Hoffman. C., Pascual. D.W., 2014. Paratransgenesis feasibility in the honeybee (*Apis mellifera*) using *Fructobacillus fructosus* commensal. *Journal of Applied Microbiology*, 1-13 pp.
- Martos. V.M., Ruiz-Navajas. Y., Fernández-López. J., Pérez-Álvarez. J. A., 2008. Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly. *Journal of food science*, 73, 9, 117-124 pp.
- Matsuzaki, S., Rashel, M., Uchiyama, J., Sakurai, S., Ujihara, T., Kuroda, M., Ikeuchi, M., Tani, T., Fujieda, M., Wakiguchi, H., Imai, S., 2005. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterialinfectious diseases. *Journal Infect Chemother*, 11, 211 – 219 pp.
- Merrill. B. D., Grose. J. H., Breakwell. D. P., Burnett. S. H., 2014. Characterization of *Paenibacillus larvae* bacteriophages and their genomic relationships to firmicute bacteriophages. *BMC Genomics*, 15, 2-18pp.

- Muyombwe. A., Tanji. Y. I., UNNO. H., 1999. Cloning and Expression of a Gene Encoding the Lytic Functions of *Bacillus amyloliquefaciens* Phage: Evidence of an Auxiliary Lysis System. *Journal of bioscience and bioengineering*, 88, 2, 221-225 pp.
- Nelson, D., 2004. Phage Taxonomy: We Agree To Disagree. *Journal of bacteriology*, 186, 21, 7029–7031 pp.
- Nelson. D. C., Schmelcher. M., Rodriguez-Rubio. L., Klumpp. J., Pritchard. D.G., Dong. S., Donovan. D. M., 2012. Endolysins as Antimicrobials. *Advances in Virus Research.* , 83, 299-365 pp.
- Nelson. D., Loomis. L., Fischetti. V. A., 2001. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *PNAS*, 98, 7, 4107–4112 pp.
- Nicolson. S. W., Human. H., 2008. Bees get a head start on honey production. *Biol. Letters*, 4, 299–301pp.
- Obeso. J. M., Martínez. B., Rodriguez. A., García. P., 2008. Lytic activity of the recombinant staphylococcal bacteriophage Φ H5 endolysin active against *Staphylococcus aureus* in milk. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 212–218 pp.
- Oliveira. H., Thiagarajan. V., Walmagh. M., Sillankorva. S., Lavigne. R., Neves-Petersen. M. T., Kluskens. L. D., Azeredo. J., 2014. A Thermostable *Salmonella* Phage Endolysin, Lys68, with Broad Bactericidal Properties against Gram-Negative Pathogens in Presence of Weak Acids. *PLOS ONE*, 9, 10, 108-376 pp.
- Oliveira. A., Melo. L. D. R., Kropinski. A. M., Azeredo. J., 2013a. Complete Genome Sequence of the Broad-Host-Range *Paenibacillus larvae* Phage philBB_PI23. *Genome Announcements*, 1, 5 e00438-13.
- Park. J., Yun. J., Jeong-A Lim., Kang. D. H., Ryu. S., 2012. Characterization of an endolysin, LysBPS13, from a *Bacillus cereus* bacteriophage. *FEMS Microbiol Lett*, 332, 76–83 pp.
- Rohwer, F., Edwards, R., 2002. The Phage Proteomic Tree: a Genome-Based Taxonomy for Phage. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 16, 184, p. 4529–4535 pp.
- Ryba, S., Titera, D., Haklova, M., Stopka, P., 2009. A PCR method of detecting American Foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in winter beehive wax debris. *Veterinary Microbiology*, 139, 193–196pp.

- Schen Erkennung von *Bacillus anthracis*. Tese de Doutorado, Inaugural-dissertation zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, 180pp.
- Schleifer. K. H., and Kandler. O., 1972. Peptidoglycan .Types of Bacterial Cell Walls and their Taxonomic Implications. *Bacteriological reviews*, 36, 4, 407-477pp.
- Schmelcher. M., Tchang. V. S., Loessner. M. J., 2011. Domain shuffling and module engineering of *Listeria* phage endolysins for enhanced lytic activity and binding affinity. *Microbial Biotechnology*, 4, 5, 651–662 b pp.
- Schmelcher. M., and Loessner. M. J., 2014. Application of bacteriophages for detection of foodborne pathogens. *Bacteriophage*, 4, e28137, 1-14 pp.
- Schmelcher. M., Donovan. D. M., Loessner. M. J., 2012. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiol*, 7, 10, 1147–1171pp.
- Schmelcher. M., Waldherr. F., Loessner. M. J., 2012a. *Listeria* bacteriophage peptidoglycan hydrolases feature high thermoresistance and reveal increased activity after divalent metal cation substitution. *Appl Microbiol Biotechnol*, 93, 633–643pp.
- Seidman. C. E., and Brent. R., 1998. Introduction of Plasmid DNA into Cells transformation using calcium chloride. *Current Protocols in Protein Science*, 13-14pp.
- Sforcin. J.M., 2007. Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 113, 1–14pp.
- Sheflo M. A., Gardner. A.V., Merrill. B. D., Fisher. J. N. B., Lunt. B. L., Breakwell. D. P., Grose. J. H., Burnett. S. H., 2013. Complete Genome Sequences of Five *Paenibacillus larvae* Bacteriophages. *Genome Announcements*, 1, 6, e00668-13.
- Shen. Y., Mitchell. M. S., Donovan. D. M., Nelson. D. C., 2012. Phage-based Enzybiotics. *Bacteriophages in Health and Disease*. EDS. Hyman. P., and Abedon. S. T., Cabi International, 216-239 pp.
- Snowdon. J. A., and Cliverb. D. O., 1996. Microorganisms in honey. *International Journal of Food Microbiology*, 31, 1-266 pp.

- Son. B., Yun. J., Lim. J.A., Shin. H., Sunggi. H., Ryu. S., 2012. Characterization of LysB4, an endolysin from the *Bacillus cereus*-infecting bacteriophage B4. *BMC Microbiology*, 12, 33, 1-9 pp.
- Sørensen. H. P., and Mortensen. K. K., 2004. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 4, 1, 1-8 pp.
- Spivak. M. and Reuter. G. S., 2001. Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. *Apidologie* 32, 555–565 pp.
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., Morris, J., 2001. Bacteriophage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 3, 45, 649-659pp. Their Taxonomic Implications. *Bacteriological reviews*, 36, 4, 407-477 pp.
- Todar, K., 2012. Bacteriophage. Site: *Todar's Online Textbook of Bacteriology*, URL: <http://textbookofbacteriology.net/index.html>, consulted in 08 Nov 2013.
- Turck. M., and Bierbaum. G., 2012. Purification and Activity Testing of the Full-Length YycFGHI Proteins of *Staphylococcus aureus*. *Plos one*, 7, 1, 1-11pp.
- Twist. R. V., and Kropinski. A. M., 2009. Bacteriophage Enrichment from Water and Soil. *Methods and Protocols, Isolation, Characterization, and Interactions*, 1, 15-21pp.
- Uchiyama. J., Takemura. I., Ikue. H., Matsuzaki. S., Satoh. M., Ujihara. T., Murakami. M., Imajoh. M., Sugai. M., Daibata. M., 2011. Characterization of Lytic Enzyme Open Reading Frame 9 (ORF9) Derived from *Enterococcus faecalis* Bacteriophage _EF24C. *Applied and environmental microbiology*, 77, 2, 580–585 pp.
- Verheust. C., Fornelos. N., Mahillon. J., 2004. The *Bacillus thuringiensis* phage GIL01 encodes two enzymes with peptidoglycan hydrolase activity. *FEMS Microbiology Letters*, 237, 289–295pp.
- Versalovic, J; schneider, M; DE bruijn, F J; lupski, J R (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5, 25-40 pp.
- Vojvodic. S., Rehan. S. M., Anderson. K. E., 2013. Microbial Gut Diversity of Africanized and European Honey Bee Larval Instars. *PLOS ONE*, 8, 8, 1-9 pp.

- Waller. G.D., 1972. Evaluating Responses of Honey Bees to Sugar Solutions Using an Artificial-Flower Feeder. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 65, 857–862 pp.
- Walmagh. M., Briers. Y., Santos. S. B., Azeredo. J., Lavigne. R., 2012. Characterization of Modular Bacteriophage Endolysins from Myoviridae Phages OBP, 201Q2-1 and PVP-SE1. *PLoS ONE*, 7, 5, 1-10 pp.
- Williamson. K. E., Wommack. E. k., Radosevich. M., 2003. Sampling Natural Viral Communities from Soil for Culture-Independent Analyses. *Applied and environmental microbiology*, 69, 11, 6628–6633 pp.
- Yuan. Y., Peng. Q., Gao. M., 2012. Characteristics of a broad lytic spectrum endolysin from phage BtCS33 of *Bacillus thuringiensis*. *BMC Microbiology*, 12, 297, 1-9pp.
- Yue. D., Nordhoff. M., Wieler. L. H., Genersch E., 2008. Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis of the interactions between honeybee larvae and *Paenibacillus* larvae, the causative agent of American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology*, 10, 6, 1612–1620 pp.

Anexos

Anexo I

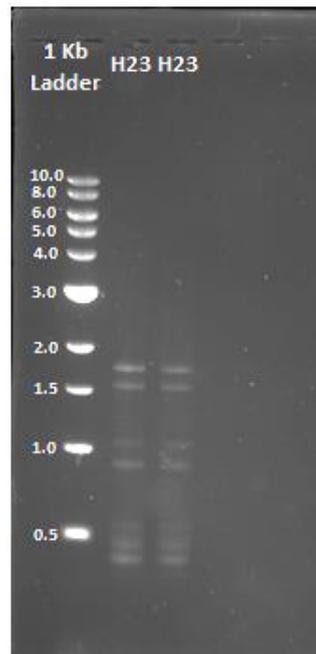


Figura A1.1. Identificação do perfil genótipo da estirpe H23, ERIC I com uma banda de migração de 970 bp e uma dupla banda com cerca 1500 bp.

Anexo II

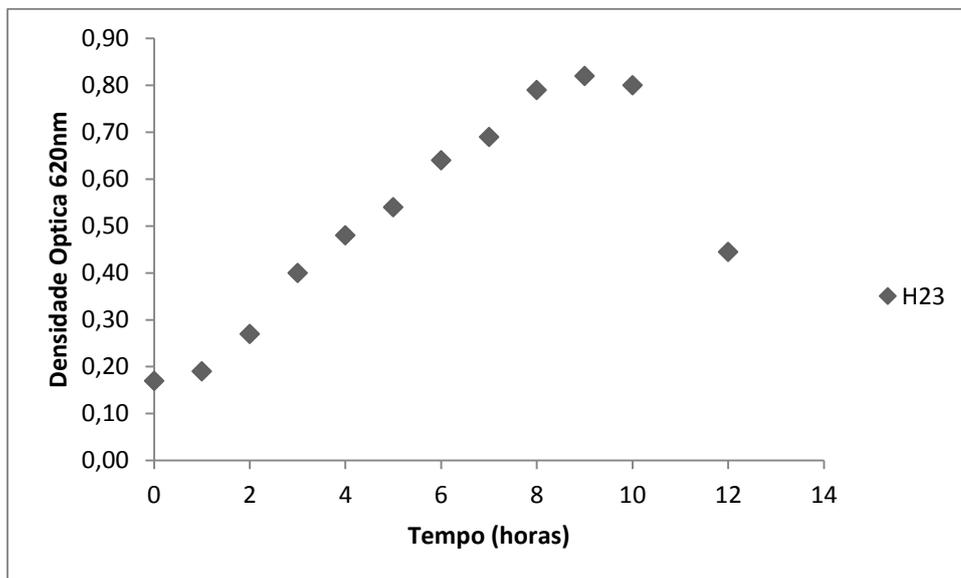


Figura A2.1 – Curva de crescimento da estirpe H23 por monitorização ao longo do tempo da DO_{620nm} .

Anexo III



Figura A3.1. Placas fágicas individualizadas do fago philBB_PI23 após incubação *overnight* a 37 °C com 5 % CO₂.

Anexo IV

```
MEIRQMLVGPSKYGIKCPNKMAPKYITFHNTYNDAPAENEIRYMI GNNNEVSFHVAVDDMEAVQG  
IPFDRNAWHCGDGNGTGNRQSIGVEICYSKSGGNRYYKAEDHAATIIAQLMKQFCIPIGNVVPHQ  
HWSGKYCPHRMLDEGRIPSFIERIKQAYEGEEDDMNRTLQLEDWQWKQLYDNMGLAWNAGKFTDW  
SWMVKIENRCLTVDELAWLNNHILASGCL*
```

Figura A4.1. Sequência proteica da endolisina PlyPI23.

Anexo V

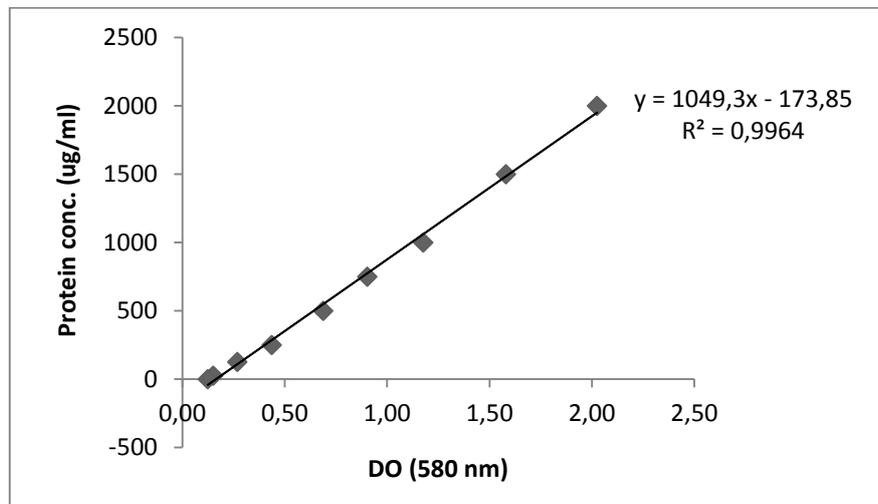


Figura A5.1 – Curva de calibração absorvância vs concentração de proteína para doseamento de proteína pelo método BCA.

Anexo VI



Figura A6.1. Colónia de abelhas de uma colmeia portuguesa, com larvas de abelhas nos alvéolos em diferentes estados larvares.



Figura A6.2. Diferentes estados larvares das larvas de abelhas, divididas de acordo com o tamanho: larvas do 1º e 2º estado larvares com comprimento de 0.33 mm e 0.47mm respetivamente; larvas do 3º e 4º estado, com comprimento de 0.70 mm e 1.05 mm, respetivamente.

Anexo VII

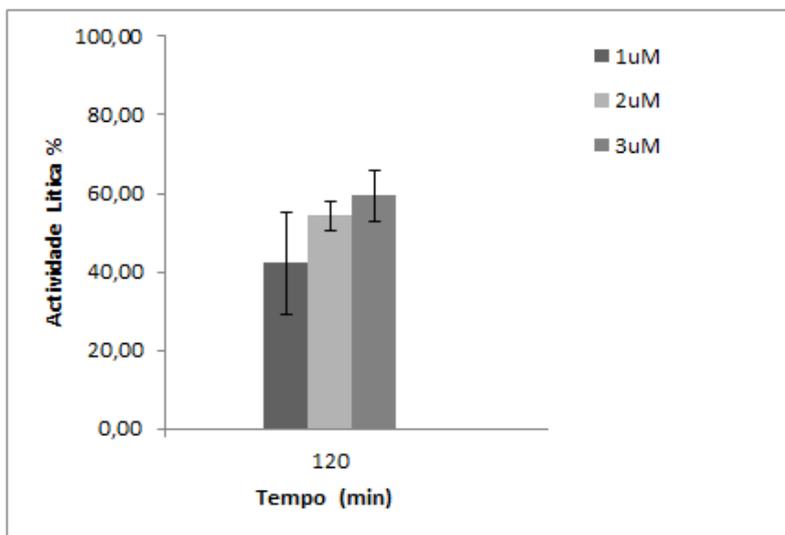


Figura A7.1. Atividade lítica absoluta (%) da PlyPI23 nas concentrações de 1, 2 e 3 μM, obtida por variação da DO_{620nm} , aos 120 min de reação.

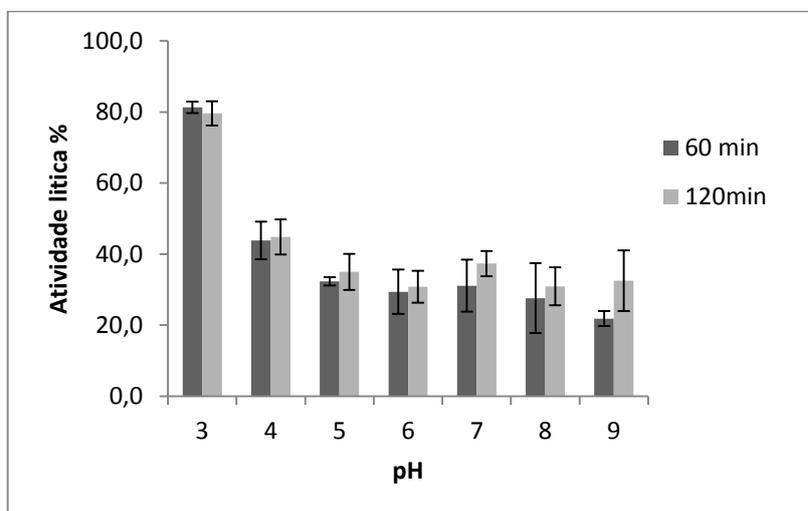


Figura A7.2. Atividade lítica absoluta (%) para os valores de pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, e 9, após 60 e 120min de reação.

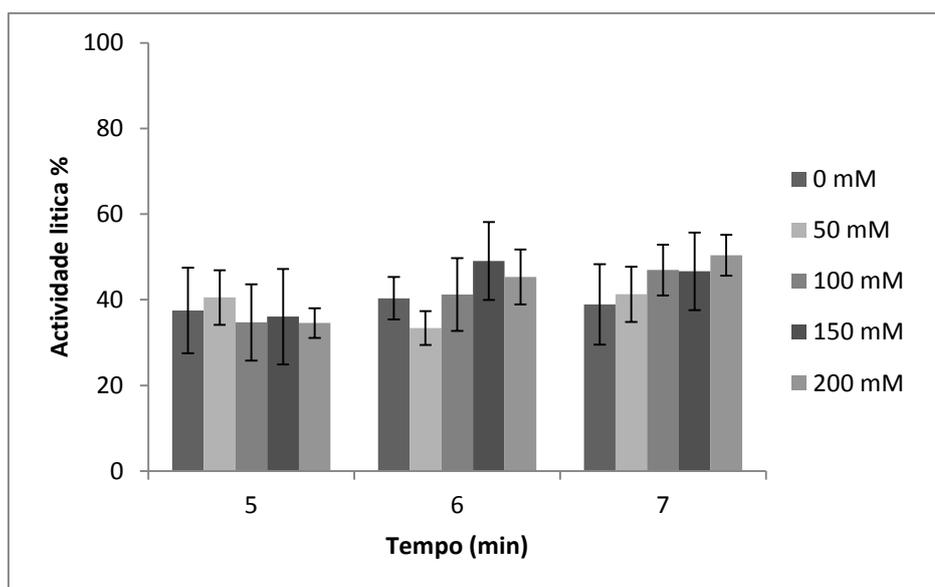


Figura A7.3. Efeito da adição de 0, 50, 100, 150 e 200 mM NaCl a soluções com pH 5, 6 e 7 sobre a atividade lítica absoluta (%) da endolisina. Dados relativos aos 120min de reação.

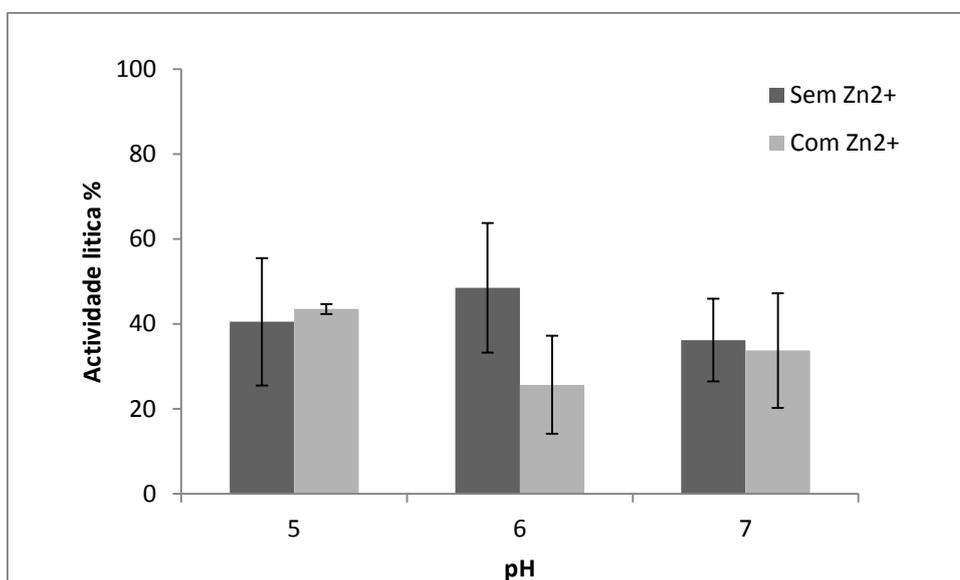


Figura A7.4. Atividade lítica (%) da PlyPI23 com e sem a adição de Zn²⁺ (0.1 mM), em soluções de pH 5, 6 e 7. Dados relativos aos 120 min de reação.

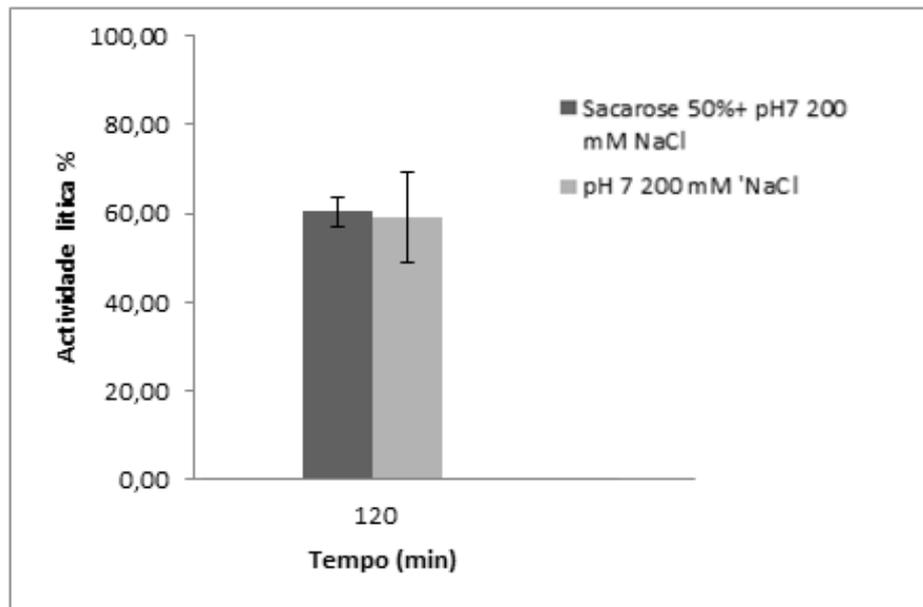


Figura A7.5. Atividade lítica absoluta (%) da PlyPI23 após contato com 50 % sacarose e posterior incorporação na solução tampão pH 7 200 Mm NaCl.

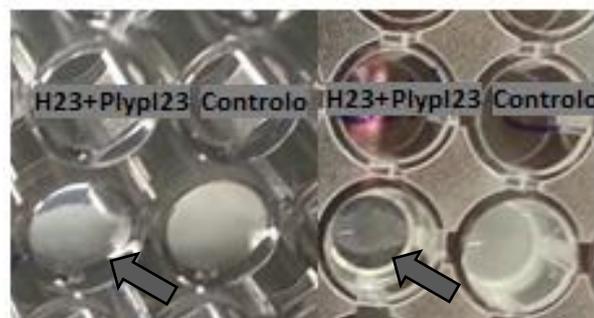


Figura A7.6. Aglomerado celular formado no centro do poço de reação (indicado por uma seta) após a adição de PlyPI23 (tampão Tris 20mM, pH 3) em comparação com o controlo (H23 Tris 20 mM pH3) para a estirpe bacteriana H23 ao 120min de reação.