



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

NAIANA CRISTINE GABIATTI

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E INCORPORAÇÃO DE
FAGOS POLIVALENTES EM ESPOROS BACTERIANOS PARA
USO EM CONTROLE BIOLÓGICO**

**FLORIANÓPOLIS
2018**

Naiana Cristine Gabiatti

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E INCORPORAÇÃO DE
FAGOS POLIVALENTES EM ESPOROS BACTERIANOS PARA
USO EM CONTROLE BIOLÓGICO**

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Área de concentração: Processos Biotecnológicos.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Moreira Soares

Coorientador: Prof. Dr. Pedro Alvarez

FLORIANÓPOLIS
2018

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

Gabiatti, Naiana Cristine

Isolamento, Caracterização e Incorporação de Fagos Polivalentes em Esporos Bacterianos para Uso em Controle Biológico / Naiana Cristine Gabiatti ; orientador, Hugo Moreira Soares ; coorientador, Pedro Alvarez.

172 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. Controle microbiano. 3. Bacteriófagos/fagos. 4. Esporos de *Bacillus subtilis*. I. Soares, Hugo Moreira. II. Alvarez, Pedro. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. V. Título.

Naiana Cristine Gabiatti

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E INCORPORAÇÃO DE
FAGOS POLIVALENTES EM ESPOROS BACTERIANOS PARA
USO EM CONTROLE BIOLÓGICO**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutora em Engenharia Química e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Florianópolis, 11 de abril de 2018.

Prof. Hugo Moreira Soares, Dr.
Orientador

Prof. Pedro Alvarez, Dr.
Coorientador

Prof^a. Cintia Soares, Dr^a.
Coordenadora do Programa

Banca examinadora

Prof. Agenor Furigo Junior, Dr.
Membro interno

Prof^a. Alcilene Rodrigues Monteiro Fritz, Dr^a.
Membro externo

Prof. Oscar Bruna-Romero, Dr.
Membro externo

Cristiano José de Andrade, Dr.
Membro externo

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, agradecer a Deus pela oportunidade de viver essa experiência de imenso crescimento pessoal e profissional, por não sucumbir nos muitos momentos difíceis ao longo dessa trajetória, por ter colocado as boas e as más pessoas no meu caminho, porque todas me ensinaram algo.

Aos meus pais, Liane e Jandir, pelo amor, pelo exemplo e por sempre acreditarem em mim e me apoiarem acima de tudo.

Ao meu noivo, Eduardo, por estar sempre ao meu lado, me incentivando a ir em busca dos meus sonhos e me dando amor, sempre.

Aos meus irmãos, Cristian e Mateus, e minhas cunhadas, Simara e Andressa, por me darem tanto orgulho, serem meus grandes amigos e me inspirarem.

Ao professor e orientador Dr. Hugo Moreira Soares, pela orientação, ensinamentos e por ter me apoiado nos momentos que precisei.

Ao professor coorientador Dr. Pedro Alvarez, por me ceder, generosamente, espaço e recursos em seu laboratório na Rice University e me orientar com dedicação ao longo de mais de dois anos.

Ao meu colega de laboratório da Rice University, Pingfeng Yu, por ter compartilhado comigo todo seu conhecimento e ter colaborado imensamente com este trabalho.

Aos meus queridos amigos, de Itá, de Florianópolis, de Porto Alegre, de Houston e os espalhados pelo Brasil e pelo mundo, por terem sido luz nos momentos de escuridão.

Aos meus avós, Valmir e Vergínia, por me ensinarem todos os dias bondade e generosidade e me darem esperança de que o mundo ainda vale a pena.

Aos colegas de laboratório da Rice University, pela ajuda prestada nos experimentos e nos entendimentos técnicos.

Aos colegas de laboratório da UFSC, pelas discussões técnicas e filosóficas, em especial, pela amizade, ao longo do caminho que trilhamos juntos.

À Rice University, pela grande oportunidade, pelos recursos, pela maravilhosa e enriquecedora experiência vivida.

À UFSC, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, servidores e professores, por contribuírem para minha formação profissional durante os anos de pós-graduação.

À CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro na realização deste trabalho.

"Olhemos para cima,
em direção às estrelas,
e não para baixo, para
os nossos pés. Trate
de dar sentido ao que
vê. Sejam curiosos"

STEPHEN HAWKING (1942-2018).

RESUMO

O controle do crescimento microbiano é um desafio crescente nas mais variadas áreas da engenharia, em especial, em sistemas de tratamento de efluentes e em setores produtivos específicos, onde a presença de determinadas bactérias, traz impactos econômico e ambientalmente negativos. Os bacteriófagos – vírus que infectam especificamente bactérias e se replicam em seu interior – têm sido utilizados como agentes de controle de crescimento microbiano em diversas áreas. Apesar do interesse renovado pela sua aplicação e importância ecológica, fagos com amplo espectro de hospedeiros ainda têm pouca representatividade nos estudos recentes. Além disso, o escopo das aplicações de fagos tem sido limitado por fatores tais como alta especificidade, resistência bacteriana aos fagos e influência de fatores físico-químicos na viabilidade e infectividade dos fagos. O objetivo deste trabalho foi demonstrar que é possível isolar fagos de amplo espectro de hospedeiros e, através da caracterização destes fagos encontrar elementos para compreender sua polivalência. Além disso, explorou-se a incorporação do genoma dos fagos em esporos de *Bacillus subtilis*, para aumentar a sobrevivência em ambientes desfavoráveis, finalmente, propôs-se uma abordagem diferenciada para o uso de fagos como ferramentas de biocontrole em sistemas de tratamentos de efluentes. Através de uma adaptação da metodologia de isolamento sequencial por múltiplos hospedeiros, isolou-se dois fagos polivalentes, denominados ϕ NA01 e ϕ NA03, capazes de infectar bactérias Gram-positivas e Gram-negativas com alta eficiência. Os principais parâmetros ligados ao ciclo de vida dos fagos, taxa de adsorção ($4,41-18,2 \times 10^{-10}$ ml/min para ϕ NA01; $4,13-5,75 \times 10^{-10}$ mL/min para ϕ NA03), *burst size* (100-120 UFP/célula e 90-110 UFP/célula, respectivamente) e período de latência (40 min e 40-50 min, respectivamente), foram determinados para os quatro hospedeiros utilizados no isolamento. Os tipos de receptores bacterianos usados pelo fago ϕ NA01 foram identificados usando células hospedeiras tratadas com periodato ou proteinase, e revelaram ser polissacarídeos para todos os hospedeiros. O fago ϕ NA01 teve seu genoma sequenciado e anotado revelando ser um fago do tipo N4, com um genoma de cerca de 76Kbp e 93ORFs. A análise genômica revelou vários genes com potencial relação com sua ampla gama de hospedeiros, incluindo a presença de três genes codificando RNA polimerase, ao mesmo tempo, forneceu informações sobre suas relações evolutivas com fagos do mesmo gênero infectando uma variedade de bactérias diferentes. Outros dois fagos polivalentes,

PBSC1 e PBSC2, após brevemente caracterizados, foram usados para otimizar uma metodologia de incorporação de fagos a esporos de *Bacillus subtilis*. As condições ótimas para maior eficiência de incorporação dos fagos aos esporos foram encontradas quando os fagos foram introduzidos nos pré-esporos com mais alta taxa de esporulação (10 h de incubação) e MOI 1,0. O tempo de maturação dos esporos de 48 h aumentou tanto o rendimento de esporos quanto a eficiência de incorporação. Comparado com os fagos livres, os fagos protegidos por esporos mostraram uma resistência significativamente maior em relação a altas temperaturas, pH extremo, radiação UVA e presença de íons cobre. Demonstrou-se que a germinação dos esporos pode ser induzida por baixas concentrações de L-alanina ou uma mistura germinativa (L-asparagina, D-glicose, D-frutose e K⁺) para desencadear a germinação e consequente liberação dos fagos protegidos dentro de 60 a 90 min. Em geral, a resiliência superior de fagos polivalentes protegidos por esporos pode permitir armazenamento dos fagos a longo prazo (não refrigerado) e melhorar a eficiência do tratamento com fagos em condições ambientais adversas. Por fim, propôs-se uma nova abordagem para o uso de fagos no controle microbiano com etapas de isolamento, produção e aplicação que se diferenciam do tratamento convencional.

Palavras-chave: Controle microbiano. Bacteriófagos/fagos. Esporos de *Bacillus subtilis*.

ABSTRACT

Microbial growth control is a challenging issue in many engineering areas, particularly, wastewater treatment systems and in specific productive sectors, where the presence of certain bacteria has economic and environmental negative impacts. Bacteriophages – viruses that specifically infect bacteria and replicate inside – have been used as microbial control agents in several areas. Despite renewed interest in its application and ecological importance, phages with broad host range still are poorly investigated in recent studies. In addition, the scope of phage applications has been limited by factors such as high specificity, bacterial resistance to phage and physicochemical factors influence on phage viability and infectivity. The aim of this study was to demonstrate that it is possible to isolate broad host range phages and, through the characterization of these phages, to find elements to understand their polyvalence. In addition, we explored phage genome trapping into *Bacillus subtilis* spores, to increase their survival in harsh environments. Finally, we proposed a new approach for phage application as biocontrol tools in wastewater treatment systems. By adapting the multi-host sequential isolation methodology, two polyvalent phages, ϕ NA01 and ϕ NA03, were isolated, both of them were able of infect Gram-positive and Gram-negative bacteria with high efficiency. The main parameters related to phage life cycle, adsorption rate ($4.41-18.2 \times 10^{-10}$ ml/min for ϕ NA01, $4.13-5.75 \times 10^{-10}$ ml/min for ϕ NA03), burst size (100-120 PFU/cell and 90-110 PFU/cell, respectively) and latent time (40 min and 40-50 min respectively) were determined for the four isolation hosts. The bacterial receptors molecules used by phage ϕ NA01 were identified using periodate or proteinase treated host cells, and were found to be polysaccharides for all hosts. Phage ϕ NA01 genome was sequenced and annotated revealing this is a N4 like phage, with a genome of about 76Kbp and 93ORFs. Genomic analysis revealed several genes with potential relationship to their wide host range, including the presence of three genes encoding RNA polymerase, at the same time; it provided information on ϕ NA01 evolutionary relationships with phages of the same genus infecting a variety of different bacteria. Two other polyvalent phages, PBSC1 and PBSC2, after being briefly characterized, were used to optimize a phage incorporation into *Bacillus subtilis* spores methodology. The optimal conditions for greater efficiency of phages incorporation into the spores were found when the phages were introduced into the pre-spores with the highest sporulation rates (10 h incubation) and MOI 1.0. The spores maturation time of 48 h increased

both spore yield and incorporation efficiency. Compared with free phages, spore-protected phages showed significantly higher resistance to high temperatures, extreme pH, UVA radiation and the presence of copper ions. It was showed that spore germination may be induced by low concentrations of L-alanine or a germinant mix (L-asparagine, D-glucose, D-fructose and K^+) to trigger germination and release protected phages within 60 to 90 min. In general, polyvalent phage trapped in spores superior resilience can allow long-term (non-refrigerated) phage storage and improve the efficiency of phage treatment under adverse environmental conditions. Finally, a new approach was proposed for the use of phages in microbial control with isolation, production and application steps that differ from conventional treatment.

Keywords: Microbial control. Bacteriophages / phages. *Bacillus subtilis* spores.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Esquema das matrizes e fluxos ambientais que deveriam ser monitorados para quantificar a disseminação da resistência a antibióticos.	38
Figura 2 Diferença entre os quatro ciclos de vida possíveis para um fago lítico.	41
Figura 3 Diferentes morfologias de bacteriófagos divididos conforme tipos de ácidos nucleicos: ssDNA (DNA de fita simples), dsDNA (DNA de fita dupla), ssRNA (RNA de fita simples), dsRNA (RNA de fita dupla).....	44
Figura 4 Ciclo celular de células formadoras de esporos com respectivos estágios de esporulação.	47
Figura 5 Fatores que afetam a efetividade do uso de fagos para biocontrole.....	56
Figura 6 Abordagem original do método de Isolamento Sequencial por múltiplos hospedeiros para obtenção de fagos polivalentes.....	63
Figura 7 Abordagem modificada do Isolamento sequencial por múltiplos hospedeiros, incluindo um hospedeiro Gram-positivo e um Gram-negativo em cada uma das etapas do processo.....	64
Figura 8 Imagem dos fagos ϕ NA01 (Podoviridae) e ϕ NA03 (Siphoviridae) obtida com microscópio eletrônico de transmissão (JEOL 2010) em que os fagos foram corados negativamente com acetato de uranila 2%. Escala de 50 nm.	83
Figura 9 Curvas de crescimento em etapa única do fago ϕ NA01 realizada para cada um dos hospedeiros de isolamento, <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Enterobacter asburiae</i> e <i>Serratia marcescens</i> , conforme indicado em cada gráfico.....	86
Figura 10 Curva de crescimento em etapa única do fago ϕ NA03 realizada para cada um dos hospedeiros de isolamento, <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Serratia marcescens</i> , conforme indicado em cada gráfico.....	86
Figura 11 Efeito inibitório do fago ϕ NA01 sobre os hospedeiros de isolamento. As curvas de crescimento contendo bactérias e o fago estão em azul e curvas em preto são o controle. A imagem das placas mostra o resultado de ensaios de dupla cama de ágar.	88
Figura 12 Fitness cost das bactérias mutantes insensíveis ao fago ϕ NA01. As bactérias mutantes que demonstraram resistência ao fago	

φNA01 foram testadas em termos de taxa de crescimento específico (A) e habilidade de formação de biofilme (B). Os asteriscos (*) representam diferença significativa (p <0,01).	89
Figura 13 Determinação dos receptores de fagos na superfície bacteriana através da taxa de adsorção após tratamento com proteinase K e periodato em comparação com culturas não tratadas (controle). Os asteriscos (*) representam diferença significativa (p <0,01).	92
Figura 14 Perda de infectividade do fago φNA01 nos diferentes hospedeiros após incubação do fago com lipopolissacarídeos (LPS) extraídos dos hospedeiros Gram-negativos <i>S. marcescens</i> e <i>E. asburiae</i>	93
Figura 15 Padrão de bandas dos produtos de RAPD PCR para φNA01 (1) e φNA03 (3) utilizando 13 primers distintos (A) P1; (B) P2; (C) Op-B03; (D) Op-C02; (E) OPA-6; (F) OPA-9; (G) OPA-13; (H) CRA-23; (I) Op-C05; (J) Op-C13; (K) Op-E07; (L) RAPD5. A letra M designa o marcador molecular de 100bp.	94
Figura 16 Mapa genômico do fago φNA01 e representação da organização funcional das ORFs. A direção das setas representa a direção de transcrição. As ORFs foram classificadas em módulos, por cores, de acordo com cada função do gene prevista.	96
Figura 17 Análise filogenética dos fagos da família N4 utilizando (A) Terminase (B) vRNA polimerase.	100
Figura 18 Matriz de similaridade de 35 fagos da família N4. Quanto mais escuro o tom de azul mais próxima a relação evolutiva entre indivíduos.	102
Figura 19 Imagem de microscopia eletrônica de transmissão dos fagos PBSC1 e PBSC2. Os fagos foram corados negativamente com acetato de uranila 2%. A escala é de 50 nm.	106
Figura 20 Estratégia geral da incorporação de fagos em esporos, aproveitando o ciclo pseudolisogênico para usar os esporos como carreadores de fagos e garantindo sua proteção e posterior liberação da progênie.	107
Figura 21 Ensaio de incorporação dos fagos PBSC1 e PBSC2 aos esporos de <i>Bacillus subtilis</i> utilizando o Método 1 e com dois MOIs diferentes. (A) Fago PBSC1 com amostras finais sem tratamento térmico. (B) Fago PBSC1 com amostras finais tratadas termicamente.	

(C) Fago PBSC2 com amostras finais sem tratamento térmico. (D) Fago PBSC2 com amostras finais tratadas termicamente.	109
Figura 22 Tempo de esporulação de <i>B. subtilis</i> e eficiência da incorporação de fagos nos esporos. (A) Densidade bacteriana (absorbância) e fração de <i>B. subtilis</i> em termos de formas refrateis (esporos) ao longo do tempo. (B) Taxa de adsorção relativa de PBSC1 durante o processo de esporulação de <i>B. subtilis</i> . Eficiência de incorporação dos fagos PBSC1 (C) e PBSC2 (D) em diferentes MOIs e tempos de incubação líquida (indução de esporulação).	111
Figura 23 Efeito do tempo de maturação (24h ou 48h) sobre as suspensões finais de esporos em termos de (A) abundância e (B) eficiência de incorporação do fago PBSC1. Os asteriscos (*) representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre 24 h de maturação e 48 h de maturação.	115
Figura 24 Imagem de microscopia eletrônica de varredura para demonstrar o efeito do tempo de maturação sobre a pureza das suspensões finais de esporos. (A) 24 h de maturação (B) 48 h de maturação. Escala de 1 μm	117
Figura 25 Drop spot test dos fagos PBSC1 e PBSC2. Os fagos originais (PBSC1 e PBSC2) e os fagos encapsulados em esporos (SPBSC1 e SPBSC2) formaram zonas líticas claras nos hospedeiros (A) <i>B. subtilis</i> e (B) <i>B. cereus</i>	118
Figura 26 Experimentos de crescimento em batelada mostrando os efeitos inibitórios PBSC1 e PBSC2 nos hospedeiros. (A1) Efeito inibitório de PBSC1 livre e PBSC1 liberado por esporos (S-PBSC1) em <i>B. subtilis</i> e (A2) <i>B. cereus</i> . (B1) Efeito inibitórios de PBSC2 livre e PBSC2 (S-PBSC2) liberado por esporos em <i>B. subtilis</i> e (B2) <i>B. cereus</i> . O MOI inicial era 10.	119
Figura 27 Imagens de microscopia eletrônica de transmissão dos fagos PBSC1 e PBSC2 após a germinação e esporos. Os fagos foram corados negativamente com acetato de uranila a 2%. A escala é de 50 nm.	120
Figura 28 Ensaios de resistência com fagos PBSC1 e PBSC2 livres e na forma encapsulada em esporos. (A) Tratamento térmico por 15 min nas temperaturas estipuladas no eixo horizontal do gráfico. (B) Exposição a diferentes pHs conforme indicado no eixo horizontal, durante 60 min. (C) Exposição à radiação UVA ao longo de 20 horas. (D) Exposição a diferentes concentrações de cobre conforme indicado no eixo horizontal.	121

Figura 29 Resistência de esporos normais e esporos infectados por fagos. O tempo de maturação do esporo foi de 48 h. A viabilidade de esporos normais e esporos infectados por fagos foi calculada com base nas UFC e COI relativas, antes e depois do tratamento, respectivamente. Esporos normais e esporos infectados por fagos apresentaram resistência ambiental similar à temperatura alta (80 °C), pH 2, Cu⁺² (1ppm) e UVA. 125

Figura 30 Viabilidade viral dos fagos PBSC1 e PBSC2 livres e do sistema fago/esporo após estoque em temperatura ambiente, protegidos da luz, durante o tempo indicado no gráfico. 126

Figura 31 Indução da germinação dos esporos e liberação da progênie do fago retido PBSC1. (A) A germinação de *B. subtilis* desencadeada por diferentes geminantes foi monitorada por mudanças na densidade óptica (DO₆₀₀ inicial = 0,8). (B) Liberação de PBSC1 retido sob diferentes condições de indução. As concentrações dos germinantes foram 20 mM para L-alanina, 20 mM para cada um dos componentes de AGFK ou 10 mM L-alanina + 10 mM cada componente de AGFK para o tratamento combinado. 128

Figura 32 Proposta de abordagem alternativa para o uso de fagos como ferramentas de biocontrole. 131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 <i>Primers</i> utilizados no estudo, próprios para RAPD PCR.....	70
Tabela 2 Composição do meio Penassay.....	73
Tabela 3 Composição do meio 121 e suplementação para meio 121B..	74
Tabela 4 Fatores de estresse ambiental testados e condições aplicadas aos experimentos de resistência dos fagos livres em comparação aos fagos incorporados aos esporos.....	77
Tabela 5 Espectro de hospedeiros e EOP relativo ao hospedeiro de produção dos fagos ϕ NA01 e ϕ NA03.....	80
Tabela 6 Constante de adsorção, período latente e <i>burst size</i> dos fagos ϕ NA01 e ϕ NA03 relacionados a cada um dos hospedeiros de isolamento.....	84
Tabela 7 EOP e parâmetros do ciclo de vida dos fagos PBSC1 e PBSC2 em relação aos hospedeiros <i>B. subtilis</i> e <i>B. cereus</i>	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BIMs - Bactérias mutantes insensíveis aos bacteriófagos

BRS - Bactérias Redutoras de Sulfato

DPA - Ácido Dipicolínico

EOP - Eficiência de plaqueamento

LPS - Lipopolissacarídeos

MCF – Microscopia de contraste de fase

MET - Microscópio Eletrônico de Transmissão

MEV - Microscópio eletrônico de varredura

MOI - Multiplicidade de Infecção

ORF - *Open Reading frames*

PBS -Tampão Fosfato Salino

PLR - Proteína de Ligação ao Receptor

PCR - *Polimerase Chain Reaction*

UFP - Unidades formadoras de placas de lise

PPM - Partes por milhão

RAPD PCR - *Random Amplified Polymorphic DNA PCR*

SASP - Proteínas de esporos solúveis em ácidos

SMB – *Salt-magnesium buffer*

TSB - *Tryptic Soy Broth*

UFC - Unidades formadoras de colônias

UV - Radiação/luz ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	27
1.1 Objetivo Geral.....	29
1.2 Objetivos específicos	29
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
2.1 Bactérias indesejáveis e a dificuldade no controle de seu crescimento	31
2.1.1 <i>Disseminação ambiental de bactérias resistentes a antibióticos</i>	35
2.2 Bacteriófagos.....	39
2.2.1 <i>Ciclo pseudolisogênico e Bacillus subtilis</i>	44
2.2.2 <i>Bacteriófagos Polivalentes</i>	48
2.3 Aplicação de fagos como ferramentas de controle biológico.....	50
2.4 Desafios no uso de fagos como ferramentas de biocontrole.	55
3. MATERIAL E MÉTODOS	61
3.1 Cepas bacterianas utilizadas e condições de cultivo	61
3.2 Obtenção de fagos polivalentes.....	61
3.2.1 <i>Preparação do estoque heterogêneo de fagos</i>	61
3.2.2 <i>Isolamento dos fagos</i>	62
3.2.3 <i>Purificação dos fagos</i>	64
3.4 Experimento em cultura líquida.....	65
3.5 Caracterização do ciclo de vida e morfologia dos fagos isolados.....	65
3.5.1 <i>Taxa de adsorção do fago</i>	65
3.5.2 <i>Curva de crescimento em etapa única</i>	66
3.5.3 <i>Microscopia eletrônica de transmissão (MET)</i>	67
3.6 Estudo da frequência de surgimento de bactérias mutantes insensíveis aos bacteriófagos (BIMs).....	67

3.7	Identificação dos receptores moleculares de fago.....	68
3.8	Caracterização molecular dos bacteriófagos isolados.....	69
3.8.1	<i>Extração e PCR do DNA viral</i>	69
3.8.2	<i>RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) PCR</i>	69
3.8.3	<i>Sequenciamento do genoma</i>	71
3.8.4	<i>Análise filogenética e busca de similaridade</i>	71
3.9	Esporulação e incorporação dos fagos em esporos.....	72
3.9.1	<i>Determinação da eficiência na incorporação dos fagos aos esporos</i>	75
3.10	Microscopia eletrônica de varredura dos esporos.....	76
3.11	Ensaio de indução da germinação dos esporos e liberação dos fagos.....	76
3.12	Testes de resistência dos fagos livres e fagos incorporados aos esporos.....	77
3.13	Análise estatística dos dados.....	78
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	79
4.1	Isolamento e espectro de hospedeiros dos fagos polivalentes	79
4.2	Caracterização morfológica e do ciclo de vida dos fagos ϕ NA01 e ϕ NA03	82
4.3	Caracterização extra da interação do fago ϕ NA01 com os hospedeiros.....	87
4.4	Caracterização molecular dos fagos.....	94
4.5	Isolamento e caracterização dos fagos utilizados	104
4.6	Definição e otimização da metodologia de incorporação de fagos aos esporos de <i>Bacillus subtilis</i>	106
4.7	Ensaio de resistências – fagos livres comparados aos fagos incorporados a esporos.....	120
4.8	Liberação controlada da progênie de fagos por meio de estimulação da germinação dos esporos.....	127

4.9 Proposição de metodologia modificada no biocontrole com uso de bacteriófagos	129
5. CONCLUSÕES.....	133
6. REFERÊNCIAS.....	135
7. ANEXOS.....	163

1. INTRODUÇÃO

O crescimento microbiano ocorre naturalmente nos mais diferentes ambientes do planeta e é regido pelas condições físicas, químicas e biológicas fornecidas, sejam estas naturais ou ligadas à atividade antropogênica. Controlar ou evitar a propagação de microrganismos nas diversas áreas e atividades onde provocam um impacto negativo tem sido um desafio para a ciência e engenharia.

Dentre os problemas mais sérios e discutidos atualmente está a rápida propagação de bactérias resistentes a antibióticos, a qual representa uma crescente ameaça à saúde humana em todo o mundo. O papel importante do meio ambiente na disseminação da resistência aos antibióticos é reconhecido, e ambientes aquático têm agido tanto como reservatórios naturais, quanto como meios para a propagação de resistência aos antibióticos clinicamente relevantes (MICHAEL *et al.*, 2013).

Bacteriófagos – vírus que infectam bactérias e se replicam em seu interior – são considerados, atualmente, as entidades mais abundantes e diversificadas do planeta (LABRIE, *et al.*, 2010). As mesmas características que facilitam a sua predominância na biosfera também possibilitam sua aplicação como agentes de controle microbiano.

Tendo coevoluído com as bactérias por bilhões de anos, os bacteriófagos possuem a capacidade de infectar seus hospedeiros especificamente e eficientemente, o que permite o controle de bactérias problemáticas com pouco impacto sobre o restante da comunidade microbiana (KOSKELLA *et al.*, 2014). Diferentemente dos antibióticos ou biocidas, cuja concentração diminui com o tempo após a dosagem, os fagos podem continuar a se replicar e infectar as bactérias alvo.

Embora descobertos em 1920, os bacteriófagos não tiveram atenção na pesquisa em desenvolvimento por muitos anos. A partir da década de 80, com a crise dos antibióticos na área da medicina, grupos de pesquisadores voltaram a demonstrar interesse na capacidade dessas entidades de infectar e matar bactérias (SULAKVELIDZE *et al.*, 2001).

Uma das principais razões que levou à falta de interesse na utilização de fagos para o controle do crescimento de bactérias foi o

baixo grau de atividade *in vivo* quando comparado com os experimentos *in vitro* (SMITH & HUGGINS, 1982). Isso ocorre porque a viabilidade dos fagos está intimamente relacionada a fatores físicos e químicos externos, tais como temperatura, acidez, salinidade, radiação UV, presença de substâncias tóxicas, entre outras, que podem causar danos irreversíveis às partículas virais (JONCZYK *et al.*, 2011). Além disso, a difusão de fagos depende da composição bioquímica do meio e essa limitação pode influenciar negativamente na acessibilidade dos fagos às bactérias alvo (MARCÓ *et al.*, 2010).

Fagos polivalentes têm um amplo espectro de hospedeiros e, apenas recentemente, vêm sendo estudados e explorados como protagonistas no controle microbiano. A habilidade de infectar múltiplas espécies tem sido vinculada como parte da evolução destes vírus, devido à alta pressão seletiva em determinados ambientes (HENDRIX *et al.*, 1999).

O sucesso da aplicação de fagos como agentes antimicrobianos vai além do isolamento de um fago capaz de infectar as bactérias alvo. Para garantir a efetividade do tratamento o fago deve ser, primeiramente, capaz de atingir seu hospedeiro dentro do sistema de aplicação, além de manter sua viabilidade de infecção.

Portanto, é necessário o estudo e desenvolvimento de estratégias eficientes de aplicação de fagos em sistemas microbianos que garantam, por exemplo, a proteção da partícula viral contra condições adversas durante sua jornada até o alvo a ser infectado.

Esporos bacterianos são reconhecidos por sua estrutura resiliente capaz de suportar condições ambientais adversas por longos períodos de tempo (NICHOLSON *et al.*, 2000). Estas características conferem vantagens para o uso de esporos no armazenamento e distribuição de produtos. Esporos de *B. subtilis* já são usados como vetores de distribuição de probióticos e antígenos. No entanto, nenhum estudo anterior focou o desenvolvimento destas estruturas como carreadores e protetores para fagos.

Alguns fagos virulentos têm a capacidade de converter seu ciclo lítico em um chamado pseudolisogênico em que o fago não promove a lise celular, nem se torna parte do DNA do hospedeiro, muito menos ocorre expressão gênica, apenas permanece no interior da célula, como

um fragmento de DNA livre. Este terceiro estágio de existência do fago nas bactérias, também conhecido como “*Phage carrier*”, geralmente acontece quando ele infecta uma célula em processo de esporulação (SONENSHEIN, 2005).

Deste modo, o isolamento de fagos polivalentes, capazes de infectar tanto bactérias patogênicas quanto *Bacillus subtilis*, seria o passo inicial para o desenvolvimento de uma proposta diferenciada de aplicação de fagos, na qual eles estejam protegidos, dentro de esporos desta bactéria não-patogênica, de fatores que comprometam sua eficiência e, com a indução do processo de germinação do esporo, sejam liberados e viabilizados de infectarem o microrganismo alvo.

Este trabalho se propôs a isolar e caracterizar fagos polivalentes de amplo espectro de hospedeiros e propor uma metodologia diferenciada para biocontrole, levando em consideração aspectos que podem interferir na eficiência do tratamento com fagos. Para tanto, estabeleceu-se uma metodologia de incorporação de fagos polivalentes a esporos de *Bacillus subtilis* para assim utiliza-los como *phage carriers*, proporcionando o transporte e proteção dos fagos contra condições adversas durante sua aplicação.

1.1 Objetivo Geral

Isolar e caracterizar fagos polivalentes de interesse no controle biológico de bactérias patogênicas. Desenvolver uma estratégia diferenciada de aplicação dos fagos na qual esporos bacterianos sejam usados como carreadores e envoltório de proteção destes fagos durante o controle de crescimento microbiano em ambientes que apresentam condições adversas, como sistemas de tratamento de efluentes urbanos e industriais.

1.2 Objetivos específicos

1. Isolar fagos com amplo espectro de hospedeiros, capazes de infectar diferentes gêneros bacterianos, utilizando a técnica de isolamento sequencial por múltiplos hospedeiros, desenvolvida no laboratório da Rice University.
2. Caracterizar os fagos isolados quanto à sua morfologia, ciclo de vida e composição molecular e entender sua relação evolutiva com os demais fagos do mesmo gênero.

3. Incorporar o DNA de fagos polivalentes a esporos de *Bacillus subtilis* e verificar se, após a germinação destes esporos os fagos seguem seu ciclo lítico e mantêm a viabilidade de infecção dos hospedeiros.
4. Otimizar a metodologia de incorporação de fagos a esporos, propondo condições experimentais que gerem maior eficiência na obtenção de esporos contendo genoma de fagos em seu interior em relação ao número total de esporos produzidos.
5. Demonstrar que os fagos protegidos pelos esporos são mais resistentes que fagos livres quando submetidos a fatores ambientais adversos.
6. Demonstrar que é possível induzir a germinação dos esporos produzidos através do uso de substâncias germinantes e assim liberar os fagos de seu interior com menor tempo latente.
7. Propor uma metodologia diferenciada da convencional para o uso de fagos no controle de crescimento de bactérias em sistemas de tratamento de efluentes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bactérias indesejáveis e a dificuldade no controle de seu crescimento

O ser humano vive em um mundo guiado por microrganismos, o qual só existe porque estes seres, dos reinos Bacteria e Archea, transformaram o ambiente hostil dos primórdios da Terra criando condições atmosféricas onde células eucarióticas fossem possíveis. Estes mesmos procariotos codificaram enzimas envolvidas até os dias de hoje nos ciclos biogeoquímicos do planeta, tendo papéis chave nos ciclos do carbono e nitrogênio e, inclusive, produzindo metade de todo o oxigênio da atmosfera (FIELD *et al.*, 1998).

Contudo, embora sejam usadas em inúmeros processos de forma controlada, como fermentação industrial, sistemas biológicos de tratamento de efluentes e produção enzimática, e as vantagens do uso de bioprocessos sejam bastante conhecidas e divulgadas, nem sempre as bactérias são organismos amigáveis para a engenharia.

O aumento populacional, com o crescimento desordenado das cidades e expansão da atividade industrial tem elevado o índice de poluição de águas naturais devido, principalmente, ao despejo de efluentes industriais e domésticos, com pouco ou nenhum tratamento. Problemas no saneamento contribuem com a dispersão de agentes infecciosos que, por sua vez, levam a um aumento de doenças transmissíveis como a cólera, diarreia infecciosa, etc. e dificultam o tratamento destes efluentes (CRAUN *et al.*, 2005). Não é por acaso que bactérias como coliformes, *Escherichia coli* e *Enterococcus spp*, são utilizadas como indicadores fecais usados para avaliar a potabilidade da água (POULLIS *et al.*, 2005).

Bactérias também encontram nos alimentos condições favoráveis à sua proliferação. Vários agentes patogênicos estão relacionados a surtos de infecção alimentar em nível mundial. As cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella spp* são as mais comumente relacionadas a problemas de contaminação alimentar. No entanto, a descontaminação de alimentos é um grande desafio, em especial na indústria, uma vez que as técnicas empregadas utilizam produtos químicos antibacterianos que podem ser eficazes, mas além de, em muitos casos, apresentarem riscos à saúde, sua intensa utilização tem

estimulado o surgimento de mecanismos de resistência, diminuindo a ação dos próprios agentes (VICENTE *et al.*, 2010).

Bacillus cereus é uma bactéria Gram-positiva, formadora de esporos (o que, inclusive, dificulta sua eliminação) facilmente isolada de amostras de alimentos secos, por exemplo. Este patógeno oportunista é reconhecido como causador de infecções alimentares desde a década de 50 (LEE *et al.*, 2011). Este microrganismo produz toxina emética e enterotoxinas, causa intoxicação alimentar, incluindo vômitos e diarreia. Apesar de ser considerado responsável por apenas 2 a 5% das infecções por alimentos nos Estados Unidos, *Bacillus cereus* também é associado a infecções potencialmente fatais não ligadas ao trato gastrointestinal devido aos vários tipos de toxinas, incluindo fosfolipases, proteases e hemolisinas, produzidas durante seu crescimento (KONG & RYU, 2015).

O controle do crescimento microbiano também se faz importante em ambientes como sistemas de tratamento biológico de efluentes, em que se deseja a predominância de determinados tipos de bactérias em detrimento de outras. Quando se trata de ambientes naturais, ainda existem dificuldades na coleta de dados sobre as comunidades bacterianas. Isso se deve ao fato de não ser possível cultivar e quantificar todas as bactérias em qualquer meio de cultivo disponível (WARD *et al.*, 1990). Além disso, a flora bacteriana dos ecossistemas naturais, como o lodo ativado, é tão divergente que, em um meio não seletivo, somente as linhagens mais dominantes podem ser isoladas mais de uma vez. Assim, os padrões de dominância de diferentes cepas bacterianas dentro de um ambiente são complicados de elucidar. Estudos sobre velocidades de crescimento ou diferenças competitivas são apenas realizados em condições laboratoriais, mas não está claro se esses resultados são relevantes para os mesmos isolados em comunidades naturais (HANTULA *et al.*, 1991).

Processos de remoção de nutrientes por lodo ativado, incluindo remoção de fósforo e nitrificação, são conhecidos por sua instabilidade. Na nitrificação, as bactérias oxidadoras de amônio e as oxidadoras de nitrito, encontram dificuldades de manter o processo, conforme a competição biológica que se estabelece nos sistemas de remoção de nutrientes por lodo ativado. Devido à taxa de crescimento lenta das bactérias nitrificantes, a nitrificação eficaz requer um lodo de idade mais avançada, a fim de evitar a perda de biomassa e desperdício. Baixas

taxas de nitrificação são atribuídas a toxicidade do meio, mas também a baixa concentração das bactérias responsáveis pelo processo pela presença de outras bactérias que dominam o nicho ecológico (WANNER *et al.*, 2000; BURGESS *et al.*, 2002).

Uma boa decantabilidade do lodo biológico é também essencial ao equilíbrio e eficiência final do processo de lodos ativados. O excesso de bactérias filamentosas representa um problema operacional comum e recorrente, responsáveis pelo fenômeno de *bulking* e formação excessiva de espuma em muitas plantas de tratamento de efluentes (MADONI *et al.*, 2000). As bactérias filamentosas mais comumente envolvidas nestes casos são dos gêneros *Microthrix*, *Gordona*, *Nocardia*, *Corynebacteria*, *Dietzia*, *Rhodococcus* e *Skermania* (SODELL, 1999).

Vários métodos têm sido desenvolvidos para manter o equilíbrio correto entre bactérias formadoras de flocos e os microrganismos filamentosos responsáveis pelos problemas com a separação de sólidos. No entanto, nenhum dos métodos são totalmente adequados. A desinfecção, por exemplo, pode resultar na mortalidade de grupos funcionais importantes, como as nitrificantes (MARTINS *et al.*, 2004).

Outro aspecto que envolve o tratamento de efluentes e a necessidade de controle de microrganismos são os lodos produzidos durante o processo de tratamento biológico, os quais contém um conjunto diversificado de bactérias patogênicas, vírus, parasitas protozoários e metazoários. Milhões de toneladas de sólidos seco são produzidos anualmente em países que utilizam estes tratamentos (HETTENBACH *et al.*, 1998). A reutilização benéfica deste lodo envolvendo a aplicação para terras agrícolas é, geralmente, considerada a melhor opção ambiental. No entanto, a falta de regulamentação e respeito aos limites de presença de patógenos têm apontado o lodo de esgoto reciclado, como vetor de transmissão de doenças humanas (DEFRA, 2002). Regulamentações mais rigorosas têm sido propostas, porém processos convencionais de tratamento projetados para atingir o máximo de redução de patógenos incorrem em custos elevados de investimento e operação.

A digestão anaeróbia é outro processo bastante utilizado no tratamento de resíduos e que requer um equilíbrio da comunidade microbiana envolvida para um resultado final satisfatório. Problemas

com acidificação de sistemas, devido ao desequilíbrio entre acidogênicas e metanogênicas culminam em um efluente pobremente tratado além de baixa eficiência na produção de metano, quando o foco é o aproveitamento energético.

A presença de bactérias redutoras de sulfato (BRS) também representa preocupação em sistemas de digestão anaeróbia. A presença de compostos de enxofre oxidados promove o crescimento de espécies dos gêneros *Desulfovibrio* e *Desulfosarcina*. Estas bactérias acabam por competir por substrato com as bactérias acidogênicas, acetogênicas e as arqueas metanogênicas, afetando também a eficácia na degradação e reduzindo a produção de metano (KALYUZHNYI & FEDOROVICH, 1998). Além disso, a produção associada de sulfeto contribui para corrosão e problemas de odor e pode levar precipitação de metais traço (STEPHENSON *et al.*, 1994).

O gás sulfídrico produzido pelas BRS também está diretamente ligado a um fenômeno encontrado em larga escala nos reservatórios de petróleo, o *souring*. A forma convencional de controle microbiano nos poços é a injeção de biocidas (MAGOT *et al.*, 2000). Contudo, essa técnica apresenta desvantagens econômicas, ambientais e baixa eficiência em certas condições. Denotando a necessidade de investigação de novas alternativas eficientes de biocontrole.

As bactérias estão presentes no ambiente sob duas formas; sésseis ou planctônicas. Na forma sésil, os conhecidos biofilmes, as células encontram-se aderidas a uma superfície e entre si formando comunidades densas e multicelulares embebidas por uma matriz de substâncias extracelulares poliméricas, enquanto na forma planctônica encontram-se livres e individualizadas (DONLAN & COSTERTON, 2002).

Embora biofilmes sejam, muitas vezes, utilizados favoravelmente em processos, incluindo tratamento de efluentes e produção de biocombustíveis, eles representam um desafio em muitas áreas, onde são considerados contaminantes como na indústria de alimentos, materiais clínicos da área da saúde humana e animal, processos de biocorrosão, contaminação de produtos, problemas de impedimento mecânico, *biofouling* e até transferência de calor (FITRIDGE *et al.*, 2012).

Os processos de filtração por membranas têm sido amplamente aplicados no tratamento de água e esgoto por muitas décadas. Preocupações relacionadas à eficácia do tratamento da membrana, tempo de vida e controle de *biofouling* têm recebido grande atenção. Para obter uma operação sustentável, com baixa demanda de energia e custo de manutenção, é necessário monitorar o desempenho da membrana e aplicar estratégias de controle dos microrganismos que podem interferir negativamente no processo (WU *et al.*, 2017).

2.1.1 Disseminação ambiental de bactérias resistentes a antibióticos

A resistência microbiana aos antibióticos é um dos maiores desafios de saúde pública enfrentados no século XXI. Estima-se que as bactérias resistentes a antibióticos causam cerca de 23.000 mortes por ano nos EUA, chegando a 25.000 na Europa. A situação é semelhante em todo o mundo, e até mesmo pior em países subdesenvolvidos, onde a alta taxa de doenças infecciosas é associada à rápida emergência de resistência microbiana (O'NEILL, 2016).

Devido ao uso indiscriminado da penicilina, na década de sessenta, 50% das cepas de *Staphylococcus aureus* já produziam enzimas que destruíam a penicilina. Este é o primeiro relato de resistência bacteriana a antibióticos. Ao longo do tempo tem-se observado um declínio na eficiência dos agentes antimicrobianos existentes e as infecções se tornaram mais difíceis e caras para se tratar. Assim, as epidemias se tornam cada vez menos controláveis uma vez que requerem o uso de drogas que são bem menos acessíveis e muito mais tóxicas (HALL, 2004).

Bactérias patogênicas com largo espectro de resistência a antibióticos tornaram-se um perigo considerável para a saúde pública, em particular para idosos, crianças e imunocomprometidos (MAHONY *et al.*, 2011). O aumento de até mil vezes na resistência aos biocidas por parte de determinados microrganismos formadores de biofilmes mais largamente utilizados (CORNELISSEN *et al.*, 2011) torna a situação ainda mais alarmante.

Além das características que naturalmente dificultam sua remoção os biofilmes ainda têm alta susceptibilidade ao desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos, a qual é atribuída a várias propriedades intrínsecas do biofilme, como difusão, alterações

fisiológicas das células, taxas de crescimento reduzidas, e a produção de enzimas que degradam os compostos antibióticos (BRIDIER *et al.*, 2011).

Nikaido (2009) expõe que algumas cepas bacterianas tornaram-se resistentes a todos os antibióticos disponíveis, surgindo as chamadas superbactérias. O chamado *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, geralmente referido como SARM, tornou-se resistente a todos os antibióticos e, inclusive a outros desinfetantes. Esta é uma das bactérias mais comumente responsáveis por infecções hospitalares.

Pseudomonas aeruginosa é um dos organismos Gram-negativos mais frequentemente isolados em diversos casos de infecção, causando problemas sérios, inclusive em pacientes imunocomprometidos (PIRES *et al.*, 2011). Uma das características mais preocupantes desta bactéria é sua baixa suscetibilidade aos antibióticos. A maioria das infecções crônicas por *P. aeruginosa* são notoriamente difíceis de tratar. Adicionalmente, esta bactéria tem uma capacidade inata de aderir a superfícies e formar biofilmes virulentos, tornando-os persistentes e particularmente difíceis de erradicar (AZIZIAN *et al.*, 2015).

De acordo com Vikesland *et al.* (2017), a estratégia ideal para combater a resistência a antibióticos é reduzir a taxa pela qual os microrganismos resistentes evoluem e se propagam. Para tanto é preciso entender este problema não apenas como uma questão da área da saúde, mas principalmente ambiental. A proposta de um acordo global envolvendo práticas para limitar a propagação de bactérias resistentes a antibióticos a partir de sistemas ambientais (como o tratamento de esgoto sanitário) seria um ponto inicial interessante.

Em seu trabalho de revisão Pruden *et al.* (2013) apontaram três fontes criticamente importantes de exposição ambiental a antibióticos e genes de resistência a antibióticos: a) agricultura terrestre; b) sistemas de tratamento de esgoto municipais e de efluentes da indústria farmacêutica e hospitais; e c) aquicultura. Limitar os impactos aos ambientes aquáticos é de especial interesse porque esses ambientes servem como uma fonte de exposição aos seres humanos por meio de uso recreativo, banho, ingestão e inalação de aerossóis.

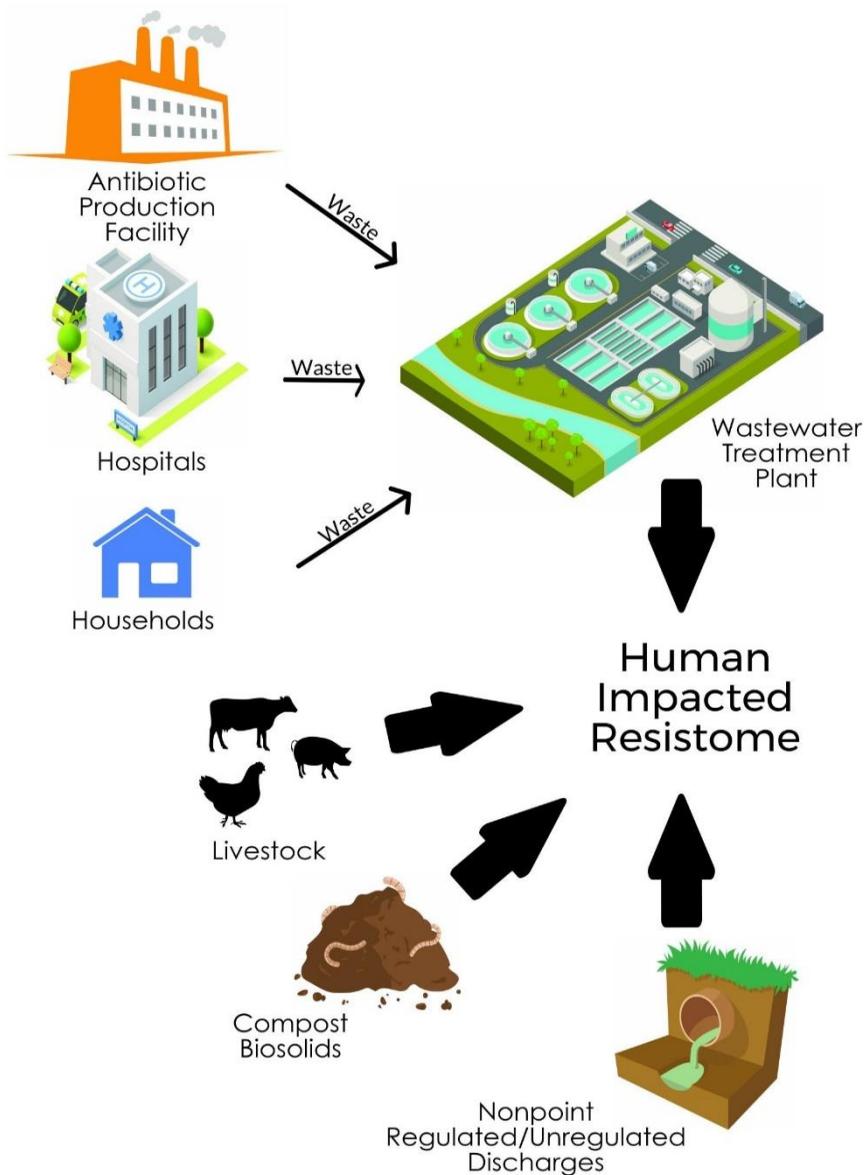
Nichos ecológicos que são ricos em nutrientes e caracterizados por altas concentrações de bactérias são ideais para o desenvolvimento e

disseminação da resistência a antibióticos. Organismos resistentes a antibióticos entram em ambientes aquáticos através de fontes humanas e animais. Estas bactérias são capazes de transferir seus genes para micróbios nativos da água que, por sua vez, também contêm genes de resistência. Por outro lado, muitos antibióticos de origem industrial circulam em ambientes aquáticos gerando alterações nos ecossistemas microbianos (BAQUERO *et al.*, 2008).

Vikesland *et al.* (2017) propõem o monitoramento da resistência a antibióticos como um contaminante ambiental, sugerindo que efluentes provenientes de residências, hospitais e fábricas de produção de antibióticos, assim como dejetos da produção de animais e biocompostos provenientes da compostagem deveriam ser constantemente monitorados. A Figura 1 apresenta um esquema das principais atividades responsáveis por nutrir o fluxo ambiental de resistência a antibióticos, culminando no chamado “resistoma”.

Resistoma é uma expressão proposta por Gerard D. Wright para designar o conjunto de todos os genes de resistência a antibióticos e seus precursores em bactérias patogênicas e não patogênicas (SURETTE & WRIGHT, 2017).

Figura 1 Esquema das matrizes e fluxos ambientais que deveriam ser monitorados para quantificar a disseminação da resistência a antibióticos.



2.2 Bacteriófagos

De acordo com Wommack e Colwell (2000), bacteriófagos são vírus que infectam exclusivamente bactérias e utilizam-se de seus recursos reprodutivos para replicarem-se. Assim sendo, estes vírus, mais conhecidos como fagos, compartilham muitas das suas características fundamentais com vírus que infectam animais e plantas e tornam-se sistemas modelo para compreender a evolução destes seres no geral, principalmente os mecanismos envolvidos na adaptação vírus-hospedeiro (DENNEHY, 2009).

Vírus são partículas infecciosas extremamente pequenas, não visíveis em microscópios óticos. Existem em uma grande variedade de formas e infectam praticamente todo tipo de sistema vivo, desde animais e plantas até insetos e bactérias. O genoma de vírus é comumente formado por apenas um tipo de ácido nucleico o qual pode estar presente na forma de uma ou de várias moléculas ribonucleicas ou desoxirribonucleicas. O capsídeo, invólucro proteico, tem como função a proteção do ácido nucleico. Em algumas partículas virais este envoltório pode ser mais complexo, tendo camadas adicionais que contenham carboidratos, lipídios e outras proteínas (ORLOVA *et al.*, 2012).

A descoberta dos fagos, há mais de um século, foi reportada por mais de um pesquisador, de forma independente. O primeiro relato se deu em 1896, quando Ernest Hankin observou que algo presente nas águas dos rios da Índia possuía propriedades antibacteriana contra cólera e que, mesmo após passar a água por um filtro de porcelana de poros bastante reduzidos esse “fator” era conservado (HANKIN *et al.*, 1986). Em 1915, Frederick Twort, um bacteriologista britânico, assim como Hankin, isolou agentes filtráveis capazes de eliminar colônias bacterianas em meios de cultura. No entanto, em função da I Guerra Mundial, Twort não deu continuidade a seus estudos. Dois anos mais tarde, Felix d’Herelle relatou observar o mesmo fenômeno e foi além, identificando o agente bactericida como um vírus parasita bacteriano, ao qual chamou “bacteriófago”, passando a realizar experimentos aplicando-os no tratamento de infecções bacterianas de disenteria (HERELLE, 1933).

Desde que d’Herelle provou em um primeiro experimento com humanos que a administração de fagos contra infecção bacteriana tinha resultados bastante positivos, muitos outros estudos foram conduzidos

na área da medicina. Empresas privadas passaram inclusive a produzir drogas terapêuticas que levavam fagos como principal agente ativo contra as mais diversas infecções.

Em função da eficácia controversa de alguns tratamentos com fagos e com o advento dos antibióticos, a produção comercial de fagos terapêuticos cessou na maior parte do mundo ocidental. No entanto, os fagos continuaram a ser utilizados terapeuticamente na Europa Oriental e na antiga União Soviética (CLOCKIE *et al.*, 2011).

A abundância dos fagos nos mais diversos ecossistemas se deve tanto à disponibilidade das próprias bactérias, quanto à sua capacidade de evoluir diante de mecanismos de resistência ou ambientes desfavoráveis.

Após a infecção do hospedeiro os fagos podem ter destinos diferentes conforme o tipo de ciclo de infecção que seguirem (Figura 2). Alguns fagos seguem o ciclo de infecção lítica ou virulento, enquanto outros, o ciclo lisogênico ou temperado, esses são os tipos mais comuns, de acordo com Calendar (2005). Contudo, outros autores ainda reportam a existência de um terceiro e um quarto ciclo, o pseudolisogênico e as infecções crônicas, respetivamente (WEINBAUER, 2004).

Ciclo lítico: neste ciclo, as células bacterianas são destruídas, através da lise celular imediatamente após a replicação do fago no seu interior. Assim que as novas partículas virais são liberadas no meio elas procuram por um novo hospedeiro para infectar. Os fagos líticos, justamente por causarem a lise celular, são os mais visados para uso no controle do crescimento bacteriano.

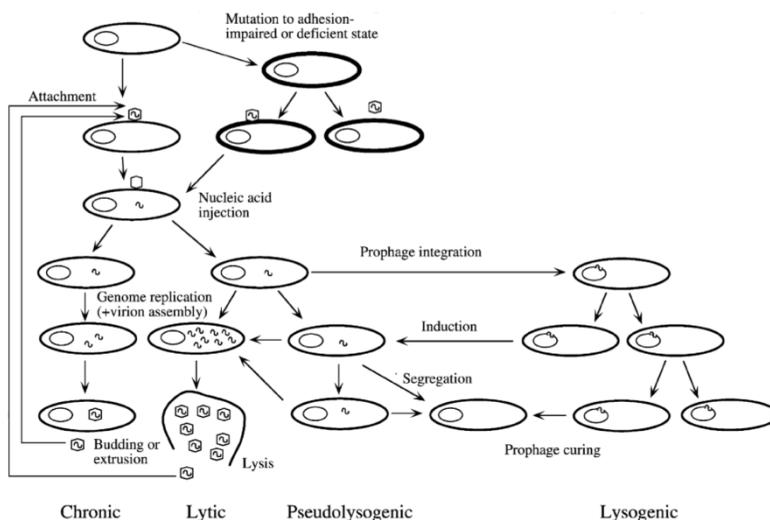
Ciclo Lisogênico: em contraste com o ciclo lítico, o ciclo lisogênico, cujos fagos que o adotam são conhecidos como “temperados”, não resulta na imediata destruição da célula do hospedeiro. O genoma viral será integrado ao DNA genômico da célula hospedeira ou pode estabelecer-se como um plasmídeo e será replicado juntamente com a replicação da própria bactéria sem, aparentemente, causar danos a mesma. Neste caso, o genoma do fago é conhecido como prófago. O vírus permanece dormente até que as condições do hospedeiro se tornem hostis, pela deterioração da própria célula, estimulando a ativação do prófago que reinicia o ciclo reprodutivo, resultando na lise da célula bacteriana. Como o ciclo lisogênico não impede a célula hospedeira de

seguir seu ciclo de vida e reprodutivo, o vírus acaba sendo reproduzido em todas as células decedentes.

Ciclo pseudolisogênico: alguns fagos virulentos são capazes de transformar seu ciclo lítico em um ciclo pseudolisogênico, no qual o fago não provoca a lise celular (ciclo lítico) e nem se integra, necessariamente, ao DNA do hospedeiro (ciclo lisogênico). O mais interessante exemplo deste ciclo diferenciado se dá quando o fago infecta uma célula em processo de esporulação. O DNA do fago, apesar de não se expressar nas células em esporulação fica “aprisionado” no endósporo em desenvolvimento, aparentemente, como um DNA livre (SONENSHEIN, 2005).

Ciclo crônico: Chamado infecção crônica ou ciclo crônico, ocorre quando uma célula bacteriana é infectada e a progênie viral é constantemente liberada por brotamento ou extrusão sem causar a lise celular do hospedeiro.

Figura 2 Diferença entre os quatro ciclos de vida possíveis para um fago lítico.



Fonte: Weinbauer (2004).

Considerando-se o ciclo de um fago lítico, os quais são de maior interesse para aplicação no controle do crescimento bacteriano, pode-se dividi-lo em quatro etapas principais (SHAO & WANG, 2008) (HENRY *et al.*, 2012):

- (1) Adsorção: inicia-se com o vírus procurando por um hospedeiro viável e, ao encontrá-lo, fixando-se na superfície da célula bacteriana.

A adsorção se dá, graças ao reconhecimento e encaixe do fago ao chamado “receptor” o qual é uma molécula específica. Esta é considerada a etapa que rege a especificidade do fago em relação ao hospedeiro, a qual, por sua vez, é dependente da natureza e particularidades estruturais dos receptores presentes na superfície da célula bacteriana (HAGENS *et al.*, 2007). A natureza destas moléculas receptoras é diferente conforme os diferentes grupos taxonômicos, além de ser fortemente determinada pela composição da parede celular e estruturas presentes na superfície da célula hospedeira (RAKHUBA *et al.*, 2010).

Portanto, os receptores pertencem a diferentes grupos bioquímicos e dentre os mais comuns estão proteínas da superfície, polissacarídeos e lipopolissacarídeos (LPS). A eficiência da infecção do hospedeiro pelo fago, não depende somente da presença da molécula receptora, mas também da sua acessibilidade e distribuição espacial na superfície celular (SAMSON *et al.*, 2013). É esta interação específica entre a proteína do fago que se liga ao receptor e o próprio receptor na superfície da célula bacteriana que origina um dos parâmetros pioneiros que definem a cinética de infecção do fago (MOLDOVAN *et al.*, 2007).

Além disso, um dos principais mecanismos de resistência de bactérias à infecção por fagos é através da alteração da disponibilidade de seus receptores ou, simplesmente, bloqueando o acesso dos fagos a eles. Em contrapartida, já foi observado que fagos também tem a habilidade de flexibilizar sua capacidade de adsorção através, inclusive, da expansão do seu espectro de hospedeiros conforme a disponibilidade de receptores alternativos (HOYLAND-KROGHSBO *et al.*, 2013).

- (2) Injeção do ácido nucleico: A penetração do ácido nucleico se dá após enzimas especiais produzidas, principalmente, nas fibras da cauda do fago, tornarem a parede celular penetrável. Enquanto o

ácido nucleico é injetado para o interior da célula, o capsídeo permanece no exterior da célula (CAMPBELL, 2007).

- (3) **Maturação:** produção e montagem de novas partículas virais, através do uso dos dispositivos de síntese da própria célula infectada.

Assim que o fago, já no interior da célula bacteriana, inicia a expressão gênica, a síntese das primeiras proteínas é voltada para o “desligamento” dos sistemas próprios do hospedeiro e a imediata replicação do genoma do fago. As proteínas expressas na sequência são envolvidas na formação das novas partículas virais e na lise do hospedeiro. Por último vem a montagem da cabeça e cauda do fago seguida do empacotamento do seu genoma (SKURNIK & STRAUCH 2006).

Para a maioria dos fagos mais estudados sabe-se que o acúmulo da progênie antes da sua liberação acontece de forma linear (WANG, 2006).

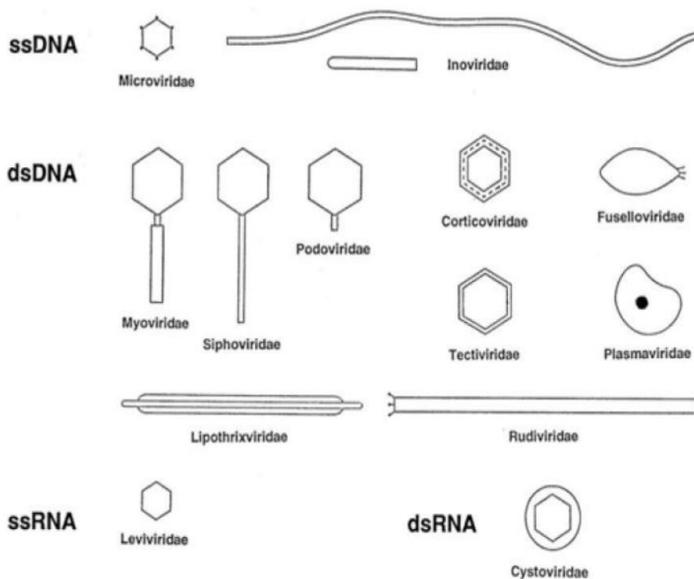
- (4) **Lise:** saída da progênie viral através da lise celular para, assim, iniciar a busca por um novo hospedeiro.

Mesmo durante a fase de maturação do fago ocorre a expressão dos genes que codificam para proteínas líticas preparando-se, desta forma, para uma eventual liberação das partículas virais formadas (YOUNG & GILL, 2015).

A classificação dos bacteriófagos é baseada em diversos fatores ligados ao seu comportamento e estrutura, como seus hospedeiros alvo, sua morfologia, tipo de genoma (RNA ou DNA, fita dupla ou simples) e estruturas auxiliares como presença de cauda e envelopes de proteção (fagos envelopados e não-envelopados).

A Figura 3 ilustra a classificação dos bacteriófagos conforme sua morfologia e tipo de ácido nucleico.

Figura 3 Diferentes morfologias de bacteriófagos divididos conforme tipos de ácidos nucleicos: ssDNA (DNA de fita simples), dsDNA (DNA de fita dupla), ssRNA (RNA de fita simples), dsRNA (RNA de fita dupla).



A maioria dos bacteriófagos descritos até hoje pertencem à ordem dos Caudovirales, apresentam cauda, cabeça icosaédrica e contêm DNA de cadeia dupla como ácido nucleico (HAGENS & LOESSNER, 2007).

Os Caudovirales são divididos nas seguintes famílias: Myoviridae (cauda longa contrátil), Siphoviridae (cauda longa não contrátil) e Podoviridae (cauda curta não contrátil). Mas é 13 o total de famílias nas quais todos os bacteriófagos são subdivididos. Seu tamanho pode variar de 24 até 200 nm e o capsídeo pode ter diferentes formatos entre icosaédrico, cúbico, filamentosos e pleomórfico (ACKERMANN, 2006).

2.2.1 Ciclo pseudolisogênico e *Bacillus subtilis*

Embora estudos sobre o processo de infecção de bactérias por fagos tenha uma longa história e seja responsável por grande parte do atual conhecimento em genética bacteriana, biologia molecular,

evolução e ecologia, ainda há muito a ser explorado, considerando-se a complexidade das interações fago-hospedeiro (CENENS *et al.*, 2013).

Conforme já mencionado, além da clássica bifurcação na propagação lítica ou lisogênica dos fagos, alguns fagos virulentos podem entrar em um estado carreador, conhecido como pseudolisogenia (SONENSHEIN, 2006).

A pseudolisogenia – estado em que o DNA de um fago lítico fica retido no interior de uma bactéria, sem dar continuidade a seu ciclo, até a célula sair do estado de dormência provocado por condições ambientais desfavoráveis – já é conhecida há dezenas de anos (LOS *et al.*, 2012), contudo seu papel tem sido subestimado quando se trata da ecologia dos fagos ou da aplicação destes.

Os bacteriófagos desenvolveram uma ampla gama de estratégias de infecção (CALENDAR, 1988) que podem permitir que eles mantenham a lisogenia por muitas gerações ou completem seu ciclo de vida dentro de um período de tempo bastante curto. Uma vez que vírus co-evoluíram com seus hospedeiros, é natural que tenham desenvolvido a capacidade de aproveitar os recursos especiais do estilo de vida de seus hospedeiros. *Bacillus subtilis* é um membro de uma grande família de bactérias que respondem ao estresse nutricional formando esporos altamente resistentes que podem permanecer adormecidos por longos períodos de tempo antes de germinar para retomar o crescimento.

Quando certos fagos líticos infectam células de *Bacillus subtilis* que estão em seus estágios iniciais de esporulação, eles não causam lise celular, no lugar disso o genoma do fago injetado permanece efetivamente adormecido e fica aprisionado no esporo (SONENSHEIN, 1970). Quando as condições favoráveis de crescimento do hospedeiro retornam, a germinação do esporo libera o genoma do fago retido, que então entra em sua fase lítica, resultando na lise da célula e na liberação da progênie do fago.

Embora os mecanismos moleculares envolvidos nessa poderosa estratégia de sobrevivência dos fagos sejam ainda bastante desconhecidos, Takashi (1961) demonstrou ser possível induzir, deliberadamente, o ciclo pseudolisogênico em fagos, através de experimentos relativamente simples, de incorporação do fago em esporos de *Bacillus subtilis*.

O esporo bacteriano representa um mecanismo de conservação de informação genética altamente eficiente (DRIKS, 2002). Esporos podem ser encontrados em amostras isoladas de, praticamente, todas as partes da superfície e subsolo terrestre (NICHOLSON *et al.*, 2000) e, ainda, associados a animais e plantas. A diversidade fenotípica e metabólica permite que sejam, inclusive, isolados de ambientes com condições extremas, como temperaturas elevadas, alta salinidade, condições ácidas ou alcalinas, entre outros (SETLOW, 2006; LOGAN & DE VOS, 2009).

Os esporos bacterianos são estruturas completamente diferentes das células vegetativas: são bem delineadas e brilhosas quando observadas em microscopia de contraste de fase (MCF), possibilitando sua distinção como “estruturas refráteis”, justamente por serem refratários à luz. Outra grande diferença em relação às células vegetativas é sua alta resistência a estresses tipicamente letais (GIORNO *et al.*, 2007). Esporos são capazes de resistir a extremos de temperatura, radiação, agentes químicos e tempo (DRIKS, 2002). Essas propriedades são conferidas aos esporos graças às características de composição química e ultraestrutura.

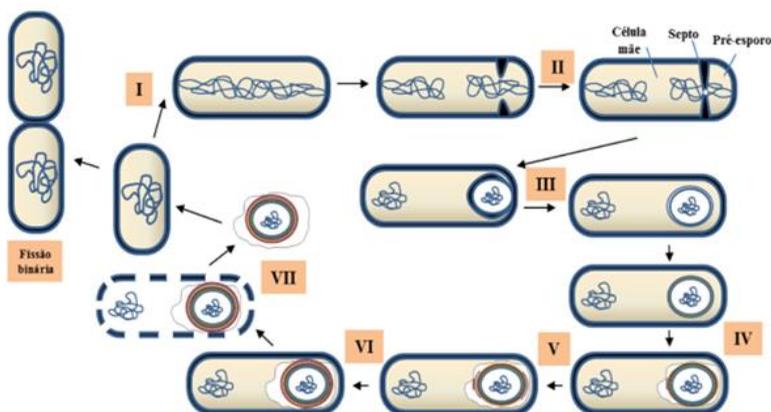
Esporos são formados durante a fase estacionária, em resposta a uma complexa rede de transdução de sinal, que integra uma variedade de características ambientais e, pelo menos, dois fatores principais: a privação de nutrientes e densidade populacional (MCKENNEY *et al.*, 2013). Com o crescimento populacional há uma elevação dos níveis de proteínas secretadas, que atuam como auto indutores de *quorum sensing*. Quando as moléculas sinalizadoras atingem níveis intracelulares elevados induzem uma extensa cascata de fosforilação e, conseqüentemente, o início da formação de um esporo ou processo de esporulação.

Taxonomicamente, a capacidade de formar esporos é a característica mais importante em nível de gênero dentro do filo *Firmicutes* (NIALL & HALKET, 2011). Embora o formato do esporo possa variar dentro das linhagens de uma dada espécie, a morfologia de uma célula em fase de esporulação é característica de cada espécie e, portanto, de grande validade para classificação. *Bacillus subtilis* estão alocados dentro da classe *Bacilli*, uma das mais representativas deste filo.

O tamanho diminuto da maioria dos esporos (<1 μm), a ampla distribuição no ambiente, resistência extrema a bactericidas convencionais, além da habilidade em permanecerem dormentes e viáveis por milhares de anos, fazem com que essas células sejam singularmente bem preparadas para sobrevivência, sendo alguns, além de tudo, patógenos eficientes. Este último é o caso de *Bacillus cereus*, conforme já descrito em item anterior.

A formação do esporo pode ser dividida em um estágio inicial 0 e sete estágios consecutivos (I à VII), morfologicamente reconhecíveis (Figura 4). Os sucessivos estágios metabólicos da esporulação foram bem estabelecidos utilizando MCF, em conjunto com microscopia eletrônica (PIGGOT & COOTE, 1976).

Figura 4 Ciclo celular de células formadoras de esporos com respectivos estágios de esporulação.



No estágio 0, ao reconhecer um ambiente bioquimicamente desfavorável ao seu desenvolvimento (por exemplo, pobre em nutrientes), uma célula em final de fase logarítmica com genoma duplicado inicia o processo de esporulação. A diferenciação se inicia com a formação do filamento axial (estágio I), seguido da formação do septo (estágio II) originando dois compartimentos, o maior deles é a célula mãe, e o menor é chamado de pré-esporo. Em seguida, a célula mãe engolfa o pré-esporo (estágio III). Logo após o engolfamento inicia-se a formação e montagem das camadas que irão compor o esporo

maduro, a deposição do córtex e possível formação do exósporo (estágio IV) e a estruturação da capa e demais componentes externos (estágio V e VI) como a crosta e apêndices externos ao exósporo. No estágio final (estágio VII), a parede celular do esporângio é degradada, liberando o esporo maduro no ambiente. Esporos são rapidamente capazes de germinar e continuar o ciclo vegetativo em resposta à presença de nutrientes (NICHOLSON& SETLOW, 1990).

A importância no entendimento dos estágios de formação dos esporos é baseada no fato de que, para que o ciclo pseudolisogênico de um determinado fago seja desencadeado, ele precisa infectar a célula durante este processo e, preferencialmente, entre os estágios I e III, uma vez que após a célula mãe engolir completamente o pré-esporo as chances do genoma do fago ficar dentro da estrutura q será o futuro esporo maduro são remotas.

2.2.2 Bacteriófagos Polivalentes

A existência de fagos polivalentes passou a ser cogitada devido a observações de concentrações relativamente alta de fagos marinhos em partes do oceano onde seus hospedeiros originais encontravam-se em número bastante reduzido dentro de um universo total de microrganismos totalmente heterogêneo. Questionando-se como seria possível estes fagos manterem seus ciclos de infecção sob condições, aparentemente, não favoráveis, concluiu-se que tais fagos poderiam ser capazes de infectar mais que uma espécie de bactéria ao mesmo tempo (CHIBANI-CHENNOUFI *et al.*, 2004).

Alguns estudos sugerem que fagos isolados de ambientes marinhos pobres em nutrientes tem tendência em direção a ampliação do seu espectro de hospedeiros, representando, possivelmente, uma adaptação à baixa concentração dos hospedeiros originais.

Tem-se observado que a coevolução de fagos junto de seus hospedeiros ao mesmo tempo que leva a um aumento de resistência por parte das bactérias, também é responsável pelo aumento da infectividade por parte dos agentes virais e, ao longo do tempo, pela ampliação do espectro de hospedeiros dos fagos (HALL, 2011). Coevolução consiste em mudanças recíprocas através de adaptação genética entre duas ou mais espécies que convivem num mesmo ambiente (WOOLHOUSE *et al.*, 2002).

De fato o espectro de hospedeiros é uma propriedade chave, tanto quando se trata de fagoterapia, quanto da própria ecologia dos bacteriófagos (ROSS *et al.*, 2016).

A maioria dos fagos isolados até o momento são, em geral, monovalentes ou contêm um espectro de hospedeiros limitado, infectando apenas algumas estirpes de bactérias dentro da mesma espécie. A alta seletividade do fago em relação a um hospedeiro pode se tornar uma estratégia mais viável sob condições de baixa diversidade de hospedeiros e alta densidade. Contudo, tratando-se de ambientes cuja população microbiana é heterogênea e as relações interespecíficas mais complexas, demonstrou-se que fagos menos específicos têm melhor desempenho (YU *et al.*, 2017a).

A etapa de isolamento do fago é a que definirá entre a seleção de um fago específico ou polivalente (MAHONY *et al.*, 2011), sendo assim, a escolha da técnica utilizada é fundamental conforme os fins aos quais o estudo se destina. Os métodos de isolamento mais explorados e utilizados até então acabam selecionando fagos altamente específicos com um espectro de hospedeiros bastante restrito (AUAD *et al.*, 1997; LIN *et al.*, 2011; LU *et al.*, 2003).

Enquanto a especificidade de um fago é considerada positiva do ponto de vista de segurança para a diversidade de um ecossistema, sendo esta, inclusive, uma vantagem apresentada em relação aos antibióticos tradicionais. Há autores que a apontam como uma desvantagem em meios onde se deseja total assepsia, como o caso de alimentos (KUMAR *et al.*, 2007).

De acordo com Sillankorva *et al.* (2010) a especificidade dos fagos em relação ao hospedeiro pode ser uma desvantagem quando aplicados em situações como remoção de biofilmes, uma vez que estes consistem em um consórcio de muitos microrganismos diferentes.

São muitos os estudos que, realizados com fagos extremamente específicos, relatam limitações na eficiência do biocontrole. Isso se dá porque o número de fagos isolados e caracterizados é limitado quando comparado a um meio com alta diversidade na população microbiana resultando em um tratamento ineficiente, mesmo quando mais de um fago específico é aplicado (CARLTON *et al.*, 2005).

Tradicionalmente, coquetéis de fagos tem sido propostos para solucionar a baixa eficiência de fagos específicos para o controle em ambientes com maior variedade de espécies bacterianas. No entanto, tentar ampliar a ação de um coquetel adicionando diferentes fagos, implica no desafio de garantir um produto com multicomponentes, bem definido e com aprovação dos órgãos regulatórios a cada mudança, por isso, Lu & Koeris (2011) defendem que, optar por protocolos ou técnicas de biotecnologia que expandam o espectro de hospedeiros de um fago único é bastante mais vantajoso.

Entre os fagos polivalentes mais conhecidos e amplamente estudados estão P1 e Mu. P1 é um fago temperado cujo principal hospedeiro é *Escherichia coli* mas é capaz de infectar outras bactérias entéricas. Mu é da família Myoviridae, também tem ciclo lisogênico e é capaz de induzir transposição genética e por esse motivo despertou muito interesse na área da biologia molecular (JENSEN *et al.*, 1998). Contudo, o estudo de poucos fagos de amplo espectro de hospedeiros, não representa o universo complexo dos fagos polivalentes. Existe muito ainda a ser explorado, estudado e observado, tanto no que diz respeito ao isolamento quanto à aplicação deste tipo de fago.

Muitos estudos sobre fagos, sua ecologia e biologia, são baseados em métodos de isolamento que podem inadvertidamente selecionar para fagos com espectro de hospedeiros restrito. Conseqüentemente, os fagos com amplo espectro de hospedeiros, cuja importância ecológica é em grande parte inexplorada, são consistentemente ignorados.

A escolha do método de isolamento a ser utilizado é a etapa mais importante para selecionar fagos polivalentes. Alguns resultados de estudos previamente conduzidos mostram que o uso de múltiplas estirpes hospedeiras durante o isolamento pode produzir de forma mais confiável fagos com maior espectro de hospedeiros (YU *et al.*, 2016; ROSS *et al.*, 2016).

2.3 Aplicação de fagos como ferramentas de controle biológico

Logo após sua descoberta, os fagos passaram a ser utilizados no controle de patógenos bacterianos, em especial na área da saúde, para tratamentos clínicos de infecções. Entretanto, a fagoterapia foi abandonada no ocidente, devido principalmente a resultados ambíguos e a descoberta dos antibióticos. Em alguns países da Europa Oriental e os

que formavam a União Soviética a fagoterapia continuou a ser utilizada (WEINBAUER, 2004).

Outro motivo da queda no interesse no uso de fagos para o controle de infecções bacterianas foi o baixo grau de atividade *in vivo* quando comparado com as pesquisas *in vitro* (SMITH e HUGGINS, 1982).

A partir da década de 80, muitos pesquisadores motivados, principalmente, pela crise de resistência a antibióticos na medicina voltaram a incluir os bacteriófagos em seu campo de interesse. O número crescente de trabalhos nesta área leva a assumir-se uma "nova era da pesquisa fagos" (BRUSSOW, 2014).

Desde então, com estudos cada vez mais complexos e bem fundamentados, percebe-se que os fagos desempenham um papel importante na ecologia de ecossistemas microbianos, tendo papel fundamental, inclusive, no ciclo da matéria orgânica na biosfera a nível global. Os fagos influenciam a evolução dos genomas bacterianos (mais obviamente no desenvolvimento da patogenicidade bacteriana) e podem fornecer ferramentas potenciais para enfrentar a crise de resistência aos antibióticos na medicina (CHIBANI-CHENNOUFI *et al.*, 2004)

Agências reguladoras dos Estados Unidos, como a US Food and Drug Administration (FDA), US Environmental Protection Agency (EPA) e United States Department of Agriculture (USDA) já têm aprovado produtos baseados em fagos, favorecendo seu uso em diversas indústrias, como de alimentos, na agricultura, e no diagnóstico clínico (SABOUR e GRIFFITHS, 2010). Exemplos de produtos de fagos disponíveis nos EUA incluem AgriPhage (Omnilytics), um tratamento para pragas bacterianas de plantas de tomate e pimenta que também é aprovado para produção de alimentos orgânicos e ListShield (Intralytix), um coquetel de fagos criado para reduzir ou eliminar a listeriose alimentar.

Uma das principais características de qualquer vírus é a sua necessidade de usar o sistema reprodutivo de seu hospedeiro para poder se replicar, no caso dos fagos, esta característica é vista como uma grande vantagem, transformando-os em agentes antibacterianos potentes e abrindo as portas para o desenvolvimento de uma séria de estudos aplicando-os como ferramentas de biocontrole.

Ao contrário do desenvolvimento de resistência aos antibióticos quimioterápicos por parte das bactérias, os bacteriófagos estão constantemente evoluindo para contornar as barreias impostas pelo hospedeiro à infecção. Isto leva a um equilíbrio evolutivo permitindo a proliferação tanto dos agentes infecciosos quanto de seus hospedeiros (CARRILLO *et al.*, 2005).

Para aplicações de controle microbiano, a maioria das pesquisas tem se concentrado no uso médico de fagos para tratar infecções específicas. Entre 1983 e 1985, seis artigos foram publicados para relatar os resultados de um grande estudo polonês que envolveu 10 hospitais, 550 pacientes (518 dos quais não responderam a antibióticos) foram tratados de septicemia bacteriana usando fagoterapia. A taxa de sucesso global, evidenciada pela recuperação acentuada ou completa, foi de 92%. Vários outros exemplos da aplicação médica bem sucedida de fagos incluem tratamento de meningite cerebrospinal, infecções cutâneas e mucosas, infecções pulmonares e doenças urológicas inflamatórias, principalmente em hospitais da Europa Oriental (SULAKVELIDZE *et al.*, 2001).

Embora desde seu descobrimento a aplicação de fagos tenha se direcionado bastante para a medicina, no tratamento de doenças infecciosas, este agente de biocontrole vem ganhando espaço em muitas outras áreas, com inúmeros estudos mostrando resultados bastante promissores.

Na área de alimentos, muitos fagos foram isolados para bactérias específicas, principais responsáveis por problemas de contaminação, tanto em etapas do processo produtivo quanto no próprio manuseio doméstico. Os alvos vão desde *Salmonella* (SILLANKORVA *et al.*, 2010; LAPP *et al.*, 2009), *Campilobacter* (JANEZ e CARRILLO, 2013), *Listeria* e *Escherichia* (GOODRIDGE e BISHA, 2011).

Estudos na área veterinária também revelaram o potencial da aplicação de fagos tanto para profilaxia quanto no uso terapêutico em aves, gado bovino e suínos (JOHNSON *et al.*, 2008).

Uma das séries mais conhecidas de estudos sobre o uso de fagos em medicina veterinária é do Instituto de Pesquisa em Doenças Animais em Houghton, Cambridgeshire, Grã-Bretanha. Os pesquisadores iniciaram a pesquisa tratando infecções experimentais de *E. coli* em camundongos (SMITH e HUGGINS, 1982). Durante estudos

posteriores, os autores descobriram que uma única dose de um fago específico para *E. coli* reduziu, por muitas ordens de grandeza, o número destas bactérias no trato alimentar de bezerros, cordeiros e leitões infectados. Todos os animais tratados por fagoterapia recuperaram-se e sobreviveram (BARROW e SOOTHILL, 1997).

Na área de saneamento, as pesquisas têm focado em sistemas de tratamento de efluentes. Fagos têm sido usados tanto para a redução de organismos patogênicos (inclusive aqueles resistentes antibióticos) quanto no controle de microrganismos que causam danos ao bom funcionamento dos lodos ativados, como no caso das bactérias filamentosas, que prejudicam o fenômeno de sedimentação do lodo (LIU *et al.*, 2015).

Um dos campos mais recentemente explorados é o uso de fagos contra biofilmes bacterianos. Muitos estudos têm se voltado para os diversos mecanismos possíveis através dos quais fagos podem destruir e controlar bactérias formadoras de biofilmes, desde dissolução da estrutura do biofilme através dos produtos formados até a infecção e morte direta dos microrganismos (CHAN e ABEDON, 2015). Em 2007 Lu & Collins realizaram um trabalho de dispersão de biofilmes através de engenharia enzimática de bacteriófagos, os quais foram desenvolvidos para produzir uma enzima degradadora de biofilmes.

Mesmo na medicina, pesquisas inovadoras sugerem o uso de fagos não apenas como agentes de biocontrole, como tradicionalmente. Yacoby *et al.* (2007) estudaram uma nova aplicação de bacteriófagos filamentosos (M13) como uma plataforma para carreamento de drogas, para a bactéria alvo que poderia inibir parcialmente a multiplicação de bactérias como o *Staphylococcus aureus*. Em conclusão, os autores afirmam que a genômica de bactérias e fagos apresentam uma nova alternativa para a melhoria da antibiótico-terapia.

A terapia com bacteriófagos para o controle microbiológico pode ser um método promissor, apresentando vantagens em comparação com outros métodos: fagos são muito eficientes em capturar seu alvo específico, se replicam apenas no subconjunto alvo de bactérias sendo inofensivos ao restante do ecossistema que o cerca, como no caso da flora natural de um organismo. Fagos são auto-limitantes, ou seja, se replicam somente na presença da bactéria, podem ser administrados em dose única e não causam efeitos paralelos indesejáveis, como no caso de agentes químicos (ATTERBURY *et al.*, 2007).

Um número restrito de estudos já existem testando a eficiência do uso bacteriófagos na remediação e prevenção do *souring* a partir do controle de BRS, tirando vantagem da capacidade de infecção e lise de células bacterianas por esse tipo de vírus.

Eydal *et al.* (2009) isolaram fagos de *Desulfovibrio aespoeensis* a partir de amostras de diferentes poços de extração de petróleo, usando o método padrão do número mais provável (NMP). Foram isolados 5 tipos de fagos diferentes denominados pelos pesquisadores: Hey1, Hey2, Hey3, Hey4 e Hey5, todos pertencentes ao grupo morfológico *Podoviridae*. Para descobrir o espectro de hospedeiros dos fagos isolados, foram utilizadas seis espécies diferentes de *Desulfovibrio*, os quais foram submetidos à infecção pelos 5 fagos. O *D. aespoeensis* foi o único hospedeiro infectado (Figura 2), revelando a especificidade restrita destes bacteriófagos. Os próprios autores sugeriram que a especificidade dos fagos pode ser minimizada através da utilização de um fago de espectro ampliado de hospedeiros ou um coquetel de fagos (mistura de fagos).

Summer *et al.* (2011) conseguiram isolar fagos, a partir de ambientes com alta salinidade, capazes de infectar ao mesmo tempo Firmicute Haloanaerobium e Desulfovibrio. Os autores obtiveram resultados satisfatórios ao testar a eficiência dos fagos no controle de crescimento de Desulfovibrio em meio líquido.

Sillankorva *et al.* (2010) expos duas espécies formadoras de biofilme, *P. fluorescens* e *Staphylococcus lentus* (em sua maioria *S. lentus*) ao fago fIBB-PF7A, que é específico apenas para *P. fluorescens*. O fago infectou seu hospedeiro, danificando parcialmente a estrutura do biofilme e liberando as células da outra espécie, não suscetível a ele, para a fase planctônica. A partir desta mudança – do biofilme para o meio livre – o tratamento com biocida comum torna-se mais efetivo, eliminando o restante dos microrganismos.

Na área ambiental se faz de suma importância o desenvolvimento de técnicas de isolamento de fagos polivalentes, em especial, quando se trata de sua aplicação em sistemas ambientais com populações heterogêneas e dinâmica complexa, como as encontradas em biorreatores ou biofilmes naturalmente formados.

Withey *et al.* (2005) discutiu o potencial dos fagos no biocontrole em sistemas de tratamento de efluentes para melhorar a

qualidade final dos efluentes finais e lodo descartado no meio ambiente, sugerindo que o controle bacteriano mediado por fagos tem o potencial de influenciar no desempenho do tratamento, controlando a abundância dos principais grupos microbianos funcionais.

O tratamento com fagos tem o potencial de controlar os problemas ambientais nos processos de tratamento de águas residuais, tais como: formação de espuma em plantas de lodos ativados; desaguamento e digestibilidade do lodo; eliminação de bactéria patogênicas; e reduzir a competição entre bactérias problemáticas e populações microbianas funcionalmente importantes. Contudo a aplicação bem-sucedida de fagos nesta área, requer uma compreensão mais completa da dinâmica e interações da comunidade microbiana destes sistemas além do aprofundamento das interações fago-hospedeiro e suas consequências para o ecossistema em questão.

2.4 Desafios no uso de fagos como ferramentas de biocontrole.

Um dos aspectos mais importantes no uso de fagos como agentes de biocontrole está em garantir a efetividade do tratamento. Para isso, é preciso mais do que apenas isolar o fago certo para o microrganismo alvo. É preciso garantir que todo o processo de aplicação, desde dosagem até a adsorção do fago nos receptores certos e a continuação de seu ciclo lítico sejam conduzidos de forma eficiente e, assim, não incorrer em erros semelhantes aos que levaram a fagoterapia a ser deixada de lado logo após sua descoberta.

De acordo com Marsh e Wellington (1994), para a multiplicação de um fago ocorrer em determinado ambiente, este fago deve ser capaz de proteger seu genoma de condições adversas, ter livre acesso ao hospedeiro, para dar início ao processo de infecção, e ser capaz de transformar a célula bacteriana em uma unidade de produção de sua progênie.

Como com qualquer agente antimicrobiano, concentrações suficientes devem ser obtidas *in situ* para garantir o controle microbiano. No entanto, o fornecimento ineficiente de fagos causado por absorção não específica, barreiras físicas ou decaimento de fagos é outro grande obstáculo para o controle microbiano baseado em fagos. A remoção de vírus durante a entrega de fagos ocorre por adsorção viral a flocos de lodo, partículas suspensas e bactérias não alvo. A penetração deficiente do fago no biofilme pode, portanto, limitar a eficácia do tratamento do

fago, uma vez que pode ocorrer a morte do fago antes de entrar em contato com a célula hospedeira (SAMSON *et al.*, 2013).

Vários fatores físico-químicos referentes ao ambiente – entre eles temperatura, acidez, salinidade e a presença de determinados íons – são determinantes para a ocorrência, viabilidade e manutenção dos bacteriófagos, sendo responsáveis, muitas vezes, pela inativação das partículas virais através de danos causados à sua estrutura física, perda lipídica e/ou mudanças na estrutura do DNA (ACKERMANN *et al.*, 2004). Outros fatores importantes também são a carga viral utilizada, o tipo de meio, umidade e fatores intrínsecos como força iônica que podem prejudicar a adsorção do fago à superfície bacteriana (CARLTON *et al.*, 2005).

A Figura 5 traz os principais aspectos que devem ser considerados para garantir a efetividade do tratamento com fagos.

Figura 5 Fatores que afetam a efetividade do uso de fagos para biocontrole.



Em virologia a proporção entre o vírus e a bactéria alvo é determinada pelo termo MOI (multiplicidade de infecção), que diz respeito à quantidade de fagos adicionada por célula durante a infecção (ELLIS & DELBRÜCK, 1939). Esta variável é muito importante no planejamento de um tratamento com fagos e para sua determinação correta é preciso levar em consideração alguns aspectos: o ciclo de replicação do fago, a resistência dele em relação às condições ambientais do meio onde será aplicado e o tipo de abordagem aplicada ao tratamento, se passiva ou ativa.

Na metodologia passiva o fago é adicionado ao sistema em quantidades suficientes para infectar e provocar a lise celular de toda população microbiana já existente em um curto espaço de tempo. O tratamento com viés ativo, implica na adição de menores quantidades iniciais de fago, o qual irá se replicar ao mesmo tempo que começa a eliminação das bactérias alvo, conforme seu ciclo lítico for acontecendo (GILL, 2010).

Embora fagos possam ser encontrados em quase todos os ambientes do planeta, resistindo a muitas condições adversas, muitos estudos já mostraram que, apesar de sobreviver, seu ciclo de vida pode ser bastante prejudicado. A proliferação de muitos fagos é limitada em pH menor que 4,5. E, dependendo do tempo de exposição, as partículas virais podem ser inativadas em valores de pH mesmo um pouco mais elevados (WATANABE *et al.*, 2007).

Vários fagos isolados, quando expostos a temperaturas superiores a 45°C por períodos de tempo não maiores que 1 hora perdem sua capacidade de formar placas de lise quando testados com o hospedeiro. Temperaturas superiores a 70°C em períodos inferiores a 30 min, extinguem completamente as partículas virais de uma amostra (LI *et al.*, 2016; MA *et al.*, 2016).

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

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

Quando se trata de reservas de petróleo, por exemplo, as condições ambientais encontradas nestes locais têm impacto importante sobre o crescimento microbiano, sua sobrevivência e as relações estabelecidas no ecossistema local.

Há poços com altas temperaturas de fundo, além de salinidade e pH extremos. No entanto, nem a pressão dentro dos reservatórios (até 500 atm) impede de todo que haja crescimento bacteriano, embora possa influenciar nas suas propriedades fisiológicas e metabólicas (MAGOT *et al.*, 2000). Portanto, estes fatores além de serem seletivos e favorecerem (aliados a outros aspectos) o crescimento de alguns microrganismos em detrimento de outros são altamente determinantes em qualquer tentativa de controle destas populações.

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

Em relação aos biofilmes, a difusão de fagos também é afetada pela fase de crescimento do hospedeiro. Células vivas ativas aumentam o processo de difusão do fago no biofilme, porque eles aumentam sua proliferação proporcionalmente ao seu crescimento, enquanto que as

células mortas adsorvem um grande número de fagos e, assim, interferem na sua difusão (HU *et al.*, 2012).

Além de todos os obstáculos externos que um fago pode encontrar antes de, finalmente, encontrar seu hospedeiro, ainda há outro aspecto relevante capaz de impedir que ele complete seu ciclo lítico: o desenvolvimento de resistência por parte da bactéria. Em ambientes naturais é comum que bactérias tenham múltiplas barreiras anti-fagos. Este é um processo natural que mantém o equilíbrio ecológico.

Bactérias podem desenvolver resistência aos fagos através de uma variedade de mecanismos de defesa. Para limitar a adsorção de fagos, as bactérias podem bloquear os receptores de fagos na superfície celular através da criação de fatores que se liguem aos sítios das moléculas receptoras (FOSTER, 2005) ou de adaptações na estrutura na estrutura tridimensional das moléculas (UHL & MILLER, 1996). Outra forma de prevenir o acesso dos fagos aos receptores é através da produção de matrizes extracelulares, que servem como barreiras físicas de proteção não apenas contra fagos, mas outros fatores de risco (HAMMAD, 1998).

O hospedeiro também pode impedir a entrada do DNA do fago após ele se ligar ao receptor. Os sistemas de exclusão de superinfecções são formados por proteínas que conferem imunidade à bactéria através do bloqueio da entrada do fago (LU & HENNING, 1994; MOAK & MOLINEUX, 2000). Os sistemas de modificação/restricção ou os sistemas CRISPR-Cas das bactérias atuam por mecanismos diferentes mas que resultam na mesma finalidade, eles reconhecem e degradam determinadas sequências do DNA do fago impedindo a continuação do ciclo lítico. Ainda, existem os sistemas abortivos de infecção aos quais a célula bacteriana recorre em casos mais extremos, uma vez que, além de promoverem a morte do fago, também resultam na morte da própria bactéria (MOLINEUX, 1991).

Para enfrentar o desafio da resistência bacteriana, o método tradicional é a adoção de coquetéis de fagos. Abuladze *et al.* (2008) relataram ausência de incidência de *E. coli* O157: H7 resistentes em alimentos tratados com um coquetel de três fagos. No entanto, Tanji *et al.* (2004) demonstraram que, embora os coquetéis possam atrasar a evolução da resistência aos fagos, bactérias e fagos eventualmente coexistirão em equilíbrio e desencadearão a resistência.

Considerando os inúmeros fatores que interferem, direta ou indiretamente, na eficiência do uso de fagos para o controle microbiano nos mais diversos ambientes, inclusive sistemas de tratamento de efluentes é evidente a necessidade do desenvolvimento de técnicas que garantam a efetividade do tratamento.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia Ambiental do Departamento de Engenharia Civil e Ambiental da Rice University, Houston-TX, sob a supervisão do Prof. Dr. Pedro Alvarez. Parte dos resultados foram produzidos em trabalho conjunto com o Dr. Pingfeng Yu.

3.1 Cepas bacterianas utilizadas e condições de cultivo

As bactérias usadas no isolamento dos fagos foram: *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* (ATCC 6051), *Bacillus cereus* NRS 248 (ATCC 10987), *Serratia marcescens* BS303 (ATCC 13880), *Escherichia coli* B (ATCC 11303) e *Enterobacter asbureae* (ATCC 35955). Além disso, também foram utilizadas as cepas *Bacillus subtilis* 168 (ATCC 23857), *Escherichia coli* C3000 (ATCC 10798), *Escherichia coli* K-12 (ATCC 15597), *Escherichia coli* NDM-1 (ATCC BAA 2452).

Todos os cultivos líquidos de microrganismos foram em meio Caldo de Soja Tripticaseína (*Tryptic soy broth* - TSB) a 37 °C. Os cultivos foram estocados no próprio meio a 4°C, sendo periodicamente repicados. Para o cultivo sólido, através de plaqueamento, *Tryptone Base-Layer Agar* (TBA) foi utilizado na camada de ágar base.

O método de dupla camada de ágar (ADAMS, 1959) foi aplicado para cultivo sólido e contagem de fagos, para tanto e *Tryptone Soft Agar* (TSA) foi utilizado na camada superior. Alíquotas de 100 µL das suspensões de fago, devidamente diluídas, foram inoculadas em 5 mL de TSA já contendo a bactéria hospedeira e disposto em banho quente, a 45°C. Em seguida o TSA foi vertido sobre o ágar base, permitindo sua solidificação e então as placas foram incubadas a 30 °C.

3.2 Obtenção de fagos polivalentes

3.2.1 Preparação do estoque heterogêneo de fagos

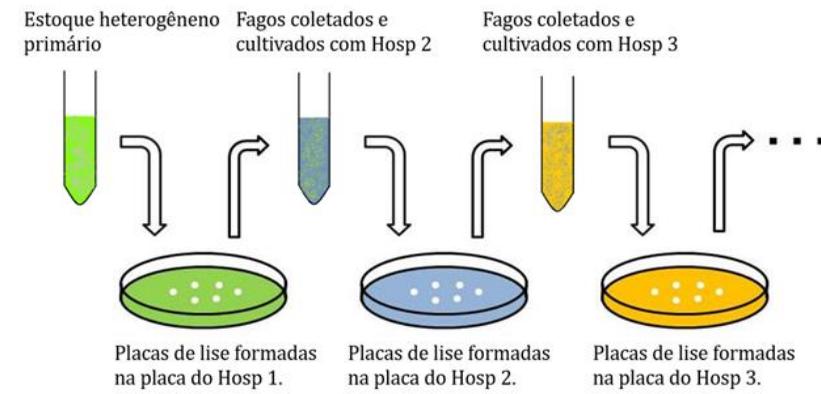
Os fagos foram isolados de estoques heterogêneos primários, os quais foram gerados a partir de amostras de solo coletadas no *Campus* da Rice University, Houston-TX. Porções de solo foram misturadas ao meio TSB em uma proporção de 1:1 (v/v), após enriquecimento *overnight*, a 37 °C e agitação de 160 rpm, a cultura foi agitada por 5 min

em vortex (Fisher Scientific) e centrifugada a 7.000 rpm por 10 min, para remoção de sólidos mais grosseiros. Para desprender os fagos dos sedimentos ainda presentes foi adotado tratamento com pirofosfato de sódio, o qual é adicionado à suspensão até chegar a uma concentração final de 5 mM, após 15 min de incubação em temperatura ambiente, protegido da luz, a suspensão passa por 30 segundos de sonicação, seguido de 3 min de agitação manual, repetidos 3 vezes (DANOVARO & MIDDELBOE, 2010). Na sequência, aplicou-se etapas de centrifugação e filtração para remover partículas maiores que 0,2 µm (PARK *et al.*, 2012). As partículas virais foram, então, concentradas, adaptando-se o método proposto por Colombet *et al.* (2007). Esta metodologia consiste em adicionar às amostras filtradas polietilenoglicol 8000 (PEG 8000 - Sigma-Aldrich) e NaCl até concentrações finais de 10 e 0,6%, respectivamente. Em seguida, incuba-se no escuro a 4 °C, por cerca de 12 h, após as quais centrifugou-se a 10000 rpm por 20 min, mantendo-se os 4 °C. O *pellet* branco obtido após a centrifugação continha os vírus cristalizados. Este *pellet* foi ressuspenso em tampão salino SMB (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7,5; 0.1 mol/L NaCl; 8 mmol/L MgSO₄; 0.01% gelatina) e filtrado em membrana para seringa de 0,22 µm.

3.2.2 Isolamento dos fagos

Para o isolamento dos fagos polivalentes utilizados neste trabalho, utilizou-se duas abordagens diferentes da metodologia de “Isolamento sequencial por múltiplos hospedeiros” descrita por Yu *et al.* (2016) e desenvolvida neste mesmo laboratório. Na abordagem original do método (Figura 6), o estoque de fago é, primeiramente, testado em um hospedeiro inicial (Hospedeiro 1) em uma placa de dupla camada de ágar. Após incubação a 37 °C, por 18 horas, as placas de lise formadas são coletadas e incubadas a 37 °C em uma cultura bacteriana diferente da primeira (Hospedeiro 2). Amostras desta cultura são coletadas após 2h, 6h e 12h de incubação, nas quais é adicionado clorofórmio em uma proporção de 5% (v/v) para promover a lise das células bacterianas. Após filtração em seringa com membrana de 0,2 µm, as amostras dos diferentes tempos são misturadas e submetidas ao ensaio de dupla camada de ágar utilizando o Hospedeiro 2. Todas as etapas mencionadas são, então, repetidas submetendo-as a uma terceira e quarta espécie de bactéria (Hospedeiro 3 e Hospedeiro 4).

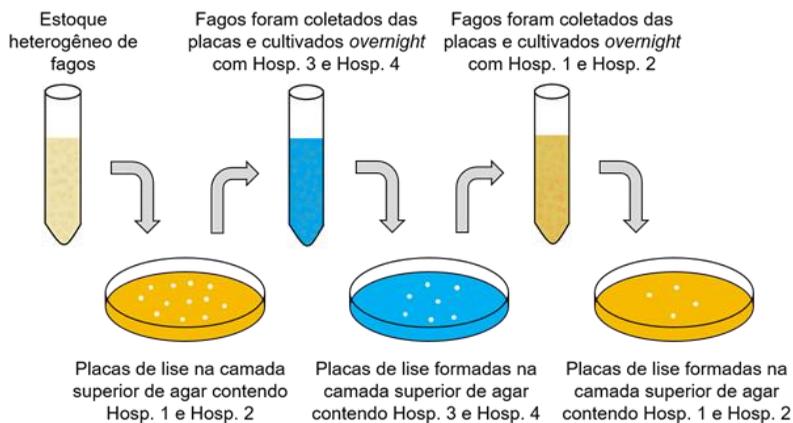
Figura 6 Abordagem original do método de Isolamento Sequencial por múltiplos hospedeiros para obtenção de fagos polivalentes



Fonte: Adaptado de YU *et al.* (2016).

No método adaptado para tentativa de isolamento de bactérias capazes de infectar tanto hospedeiros Gram-negativos quanto hospedeiros Gram-positivos, aplicou-se dois hospedeiros simultaneamente em cada placa de dupla camada de ágar (Figura 7), sendo um Gram-positivo e um Gram-negativo, induzindo-se assim, a seleção de fagos capazes de infectar ambos os hospedeiros ao mesmo tempo. E, ao final, uma única placa de lise foi coletada da última placa contendo os hospedeiros 1 e 2 foi diluída em SMB.

Figura 7 Abordagem modificada do Isolamento sequencial por múltiplos hospedeiros, incluindo um hospedeiro Gram-positivo e um Gram-negativo em cada uma das etapas do processo.



3.2.3 Purificação dos fagos

Os fagos isolados foram purificados através de três plaqueamentos sucessivos com seleção de placas de lise únicas em cada um, de acordo com procedimento padrão (SAMBROOK *et al.*, 1989). Em uma nova etapa de concentração adicionou-se polietilenoglicol 8000 (PEG-8000) na concentração de 10% (p/v) com incubação a 4°C durante 24 horas conforme Colombet *et al.* (2007).

Os estoques finais dos fagos isolados foram enumerados através da contagem de placas de lise em placa de dupla camada de ágar (UFP/mL), mantidos a 4°C em SMB e periodicamente renovados através de enriquecimento com o hospedeiro de produção.

3.3 Espectro de hospedeiros dos fagos isolados e eficiência de plaqueamento (EOP)

O primeiro passo na determinação de quais bactérias o fago é capaz de infectar é o ensaio “*Drop Spot test*” (KUTTER, 2009). Este método consiste em depositar uma gota (10 µL) da suspensão de fagos em questão – preferencialmente com uma concentração acima de 10⁸ UFP/mL – na camada superior de uma placa de dupla camada de ágar

onde a bactéria já foi adicionada ao TSA (camada superior) e incubá-la *overnight*.

Quanto ao EOP, este é um valor relativo referente à contagem de placas de lise em uma dada bactéria hospedeira comparada com a contagem máxima obtida no hospedeiro principal, ao qual atribui-se EOP de 1,0. Para a contagem das placas de lise utilizou-se o método de dupla camada de ágar utilizando-se os diferentes hospedeiros revelados pelo *Drop Spot Test*.

3.4 Experimento em cultura líquida

Testes em cultivo líquido foram realizados com o intuito de demonstrar o potencial inibitório dos fagos no crescimento das bactérias hospedeiras. Estes experimentos também são uma forma de confirmar o espectro de hospedeiros de um fago.

Os experimentos, em batelada, foram conduzidos em placas de 96 poços onde a densidade ótica (OD_{600}) do líquido foi monitorada. Cada poço foi inoculado com a bactéria em fase de crescimento exponencial, em uma concentração próxima a 10^8 UFC/mL. A concentração de fagos utilizada foi de 10^9 UFP/mL, garantindo um MOI inicial de 10 com relação a todos os hospedeiros.

O leitor de placas SpectraMax Gemini XPS Microplate Reader da Molecular Devices – MA, foi configurado com os seguintes parâmetros: 600nm, 30°C, 12 horas de processo, com agitação de 2s antes das leituras, as quais foram realizadas a cada 30 min desde o tempo zero.

3.5 Caracterização do ciclo de vida e morfologia dos fagos isolados

3.5.1 Taxa de adsorção do fago

Os experimentos de adsorção dos fagos foram realizados conforme descrito em Kropinski (2009). Diluiu-se uma cultura do hospedeiro em fase exponencial de crescimento até se obter uma DO_{650} de 0,1-0,2. Em um agitador (Multi-Therm Shaker, BenchMark Scientific-NJ), a 60 rpm e 30°C, adicionou-se 1 mL da suspensão de fagos, contendo cerca de 10^5 PFU/mL, a 9 mL da cultura de bactérias. Foram retiradas alíquotas de 50 μ L em intervalos de 1 minuto, até completar 12 min (T_1 a T_{12}). A cada coleta as amostras foram diluídas

em 0,95 ml de SMB resfriado contendo 25 μL de clorofórmio, e agitadas vigorosamente por 10s. Uma amostra inicial e uma última (C_0 e C_{13}) foram retiradas de um tubo de controle contendo 1 mL da mesma suspensão de fagos e 9 mL de TSB e mantidos nas mesmas condições do tubo de reação. Após coletadas, as amostras foram imediatamente submetidas ao ensaio de *Double Layer Agar* com o mesmo hospedeiro utilizado no ensaio e o número de placas de lise foi contabilizado após incubação *overnight*. O número de bactérias foi determinado em termos de UFC/mL por plaqueamento da suspensão celular original utilizada no experimento através de *spread plate*. A taxa de adsorção foi calculada com base na seguinte equação:

$$kB = \frac{\ln(P_0) - \ln(P_t)}{t}$$

Onde:

k = constante da taxa de adsorção (mL/min)

B = concentração bacteriana (UFC/mL)

P_0 = concentração de fagos livres em $t=0$ (UFP/mL)

P_t = concentração de fagos livres no tempo t (UFP/mL)

3.5.2 Curva de crescimento em etapa única

O tempo latente e *burst size* são parâmetros importantes para a caracterização do ciclo de vida do fago. No ensaio de curva de crescimento em etapa única, o ciclo de uma infecção única de um determinado fago, propagado num dos seus hospedeiros, é monitorado em termos de produção da progênie. O experimento foi realizado conforme descrito por Middelboe *et al.* (2010). Alíquotas de uma cultura bacteriana enriquecida *overnight* foram misturadas à solução de fagos num MOI de aproximadamente 0,01, de modo a permitir a adsorção das partículas de fago na superfície das bactérias. Após 10 minutos de interação, a solução foi centrifugada a 10.000 rpm por 3 min. O *pellet* foi lavado, centrifugado novamente e ressuspenso em 1 mL de TSB. 50 μL foram utilizados para inocular 50 mL de TSB fresco, incubados a 30°C e agitando a 160 rpm. Amostras de 50 μL foram coletadas a cada 10 min durante as 2 horas de experimento, diluídas imediatamente em 950 μL de SMB em gelo e submetidas a ensaios em dupla camada de ágar para contagem de fagos.

3.5.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Cerca de 8 μL das suspensões purificadas de cada fago foram depositadas sobre *grid* de 200 mesh revestido com formvar-carbono. Em cada *grid* as amostras depositadas foram coradas negativamente com acetato de uranila 2% (pH 4,5) (ACKERMAN & HELDAL, 2010). O excesso de corante foi removido imediatamente e o material corado foi submetido à secagem em temperatura ambiente durante 30 min. A observação foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão JEOL 2010 a uma tensão de operação de 80 kV. Com base na sua morfologia, a identificação e classificação de fagos foram conduzidas de acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (KING *et al.*, 2012).

3.6 Estudo da frequência de surgimento de bactérias mutantes insensíveis aos bacteriófagos (BIMs)

Cepas mutantes insensíveis aos bacteriófagos (BIMs) foram obtidas a partir de todos os hospedeiros isolados. O método foi aplicado conforme descrito anteriormente (GUTIÉRREZ *et al.*, 2015). Alíquotas de 100 μL de cada bactéria de isolamento ($\sim 1 \times 10^8$ UFC/mL) juntamente com 100 μL do fago ($\sim 1 \times 10^9$ UFP/mL) foram plaqueadas pelo método de dupla camada de ágar e incubadas por 24 h a 30°C. As colônias bacterianas sobreviventes foram coletadas e cultivadas em meio nutritivo, sendo incubadas overnight a 37°C. A razão entre o número de colônias sobreviventes e o número de bactérias inicialmente inoculadas (10^8 UFC/ml) foi calculada como a frequência de surgimento de BIMs. O *drop spot test* foi realizado para confirmar a falta de suscetibilidade dos novos BIMs isolados aos fagos.

A taxa de crescimento específico e habilidade de formação de biofilme dos BIMs foram medidos para avaliar os *fitness costs* de resistência a fagos. As taxas de crescimento específico bacteriano foram determinadas com base nas medições de absorbância (OD595) durante a fase de crescimento exponencial de 12 horas em equipamento para leitura de placas de 96 poços (SpectraMax Gemini XPS Microplate Reader, Molecular Devices – MA).

O ensaio de formação de biofilme em microplaca foi realizado para medir o biofilme formado na superfície de placas de cultura de 96 poços conforme resumido abaixo (O'TOOLE *et al.*, 2011).

Após cultivo *overnight* das culturas bacterianas, individualmente, em meio TSB. No dia seguinte as culturas foram diluídas em proporção 1:100 (v/v) em meio M63, especial para biofilmes, e distribuiu-se 100 µL para cada poço de uma microplaca de 96 poços. Para ensaios quantitativos, utilizou-se 4-8 poços replicados para cada tratamento. Incubou-se a microplaca a 37°C durante 24 horas.

Após lavagem da microplaca em água ultrapura, o biofilme foi corado adicionando-se 125 µL de uma solução 0,1% de violeta de metila a cada poço. Incubou-se a a microplaca por 15 min à temperatura ambiente, lavou-se de 4 vezes com água submergindo, cuidadosamente, em banho, e secou-se com papel toalha. Para quantificar o biofilme adicionou-se 125 µL de solução 30% de ácido acético em água a cada poço da microplaca para solubilizar o corante violeta. Incubou-se novamente à temperatura ambiente por 15 min e transferiu-se 125 µL do corante solubilizado para uma nova microplaca de fundo chato.

A absorbância foi quantificada num leitor de placas a 550 nm utilizando ácido acético a 30% em água como branco.

3.7 Identificação dos receptores moleculares de fago.

A identificação das moléculas que atuam como receptores de fagos na superfície microbiana foi realizada conforme descrito por Kiljunen *et al.* (2011). Parte das culturas bacterianas dos quatro hospedeiros de isolamento foram tratadas, individualmente, com Proteinase K (0,2 mg/mL; Promega), a 37°C por 3 horas. Em seguida foram lavadas com TSB, centrifugadas (8000 rpm, por 5min) e ressuspensas em TSB novamente até atingir o volume original. Após garantir que as suspensões bacterianas atingissem uma absorbância padrão em OD₆₀₀, os ensaios de adsorção dos fagos às células tratadas foram realizados conforme já descrito no item 3.5.1. Para confirmar que o resultado diferenciado na taxa de adsorção do fago não provinha da incubação a 37°C, os mesmos ensaios de adsorção foram realizados com amostras das bactérias incubadas nas mesmas condições, mas na ausência de proteinase K.

Enquanto isso, para verificar a possibilidade de os receptores de fagos serem sacarídeos, 1,5 mL de cada cultura microbiana foi submetida ao tratamento com periodato. Para tanto, centrifugou-se as culturas originais (10.000 rpm, por 5 min) e ressuspendeu-se o *pellet* em 50 mM acetato de sódio (pH 5,2) contendo 100 mM de IO₄⁻. As

amostras foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente e protegidas da luz. Posteriormente foram centrifugadas novamente (10000 rpm, por 5 min), lavadas com TSB e ressuspensas no mesmo meio até o volume original. Os mesmos ensaios de adsorção foram realizados com as amostras tratadas, garantindo também a presença de culturas controle.

Para determinar se LPS poderiam aderir às proteínas de ligação aos receptores (PLR) dos fagos, extraiu-se LPS de culturas de *E. asburiae* e *S. marcescens* utilizando o kit de extração de LPS da Intron Biotechnology, seguindo as instruções do fabricante.

Os ensaios de inativação de fago foram realizados conforme descrito anteriormente (DANIS-WLODARCZYK *et al.*, 2015). Suspendeu-se o LPS em água ultrapura estéril em concentrações finais de 400 µg/mL, 200 µg/mL, 80 µg/mL, 10 µg/mL e 1 µg /mL. As suspensões de fago nas concentrações finais em torno de 1×10^5 UFP/mL foram adicionadas a cada diluição de LPS. As suspensões foram incubadas a 37 °C, por 1 h, com agitação de 180 rpm. Após a incubação, foram realizados ensaios de dupla camada de ágar com cada hospedeiro para obter o número e fagos aptos a infectar cada um.

3. 8 Caracterização molecular dos bacteriófagos isolados

3.8.1 Extração e PCR do DNA viral

O DNA genômico dos fagos foi isolado a partir de estoques purificados e previamente tratados com DNase por 30 min a 37°C conforme Culley *et al.* (2010). Utilizou-se ZR Viral DNA Kit, da Zymo Research, para fazer a extração do DNA viral seguindo as instruções indicadas pelo fabricante. Posterior purificação e concentração do produto de extração se deu através do uso do *kit* Genomic DNA Clean & Concentration também da Zymo Research.

3.8.2 RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) PCR

A técnica de RAPD foi aplicada de acordo com Gutiérrez *et al.* (2011), para avaliar a diversidade genética e o polimorfismo dos fagos. Foram utilizados 12 *primers*, um para cada reação.

A Tabela 1 indica cada primer com respectiva sequência de nucleotídeos e referência bibliográfica.

Tabela 1 *Primers* utilizados no estudo, próprios para RAPD PCR.

Primer	Sequência de nucleotídeos	Referência bibliográfica
P1	5'-CCG CAG CCA A-3'	Gutiérrez <i>et al</i> (2011)
P2	5'-AAC GGG CAG A-3'	Gutiérrez <i>et al</i> (2011)
RAPD5	5'-AAC GCG CAA C-3'	Gutiérrez <i>et al</i> (2011)
OPA-6	5'-GGT CCC TGA C-3'	Winget & Wommarck (2008)
OPA-9	5'-GGG TAA CGC C-3'	Winget & Wommarck (2008)
OPA-13	5'-CAG CAC CCA C-3'	Winget & Wommarck (2008)
CRA-23	5'-GCG ATC CCC A-3'	Winget & Wommarck (2008)
Op-B03	5'-GAT CCC CCT G-3'	Marei (2013)
Op-C02	5'-GTG AGG GGT C-3'	Marei (2013)
Op-C05	5'-GAT GAC CGC C-3'	Marei (2013)
Op-C13	5'-AAG CCT CGT C-3'	Marei (2013)
Op-E07	5'-AGA TGC AGC C-3'	Marei (2013)

A amplificação foi realizada em reações de 50 μ L usando GoTaq Hot Star Polymerase (Promega Corporation, WI), 8 mM de cada *primer* por reação individual e cerca de 10 ng de DNA genômico. O PCR foi realizado em termociclador T100TM (Bio-Rad, Hercules) com as seguintes configurações de ciclos: Quatro ciclos a 94°C por 45s, 30°C por 120s e 72°C por 60s; 26 ciclos a 94°C por 5s, 36°C por 30s e 72°C por 30s (a etapa de extensão foi prolongada por 1 s a cada novo ciclo); a última etapa foi de 10 min a 75°C.

Os produtos do PCR foram submetidos a gel eletroforese (1% agarose gel) para observar o padrão de bandas. A corrida foi realizada a 100 V e o marcador utilizado foi de 100 pb.

3.8.3 Sequenciamento do genoma

O sequenciamento do genoma do fago ϕ NA01 foi realizado em sequenciador Illumina MiSeq (MR DNA, Texas, EUA), com leituras de 2x150bp. As bibliotecas de DNA foram preparadas utilizando-se o kit Illumina Nextera DNA Library Preparation, seguindo as instruções do fabricante. A montagem do genoma foi realizada utilizando-se a5-miseq pipeline (<https://sourceforge.net/projects/ngopt/>) (COIL *et al.*, 2015) e a anotação inicial foi realizada com o programa online PHASTER (<http://phaster.ca/>) (ARNDT *et al.*, 2016). Para os genes cujas proteínas preditas não possuem equivalentes no banco de dados de vírus usando uma busca padrão do BLAST, um programa mais sensível, o PSI-BLAST, foi adotado para fazer conexões com proteínas de fagos de função conhecida. Os genes que codificam RNAt foram identificados com auxílio do *software online* tRNAscan-SE (LOWE e EDDY, 1997). Para visualização de mapa genômico e pipeline de anotação, utilizou-se o servidor CGview (GRANT e STOHARD, 2008). A montagem final do mapa genômico foi realizada com o software SnapGene (GSL Biotech). As sequências do genoma dos fagos serão submetidas à biblioteca do GenBank e atribuídas com o número de acesso apropriado.

3.8.4 Análise filogenética e busca de similaridade

As sequências do genoma e anotações dos 34 fagos do tipo N4 previamente sequenciados foram coletados a partir do banco de dados do NCBI Genbank (Tabela A1, em Anexo). Identificou-se grupos de genes ortólogos entre os fagos em questão utilizando-se Proteinortho (v5.15) (LECHNER *et al.*, 2011). Para os grupos de genes ortólogos de um-para-um que foram totalmente compartilhados entre os 35 genomas de fagos estudados, o alinhamento da sequência codificada de cada grupo foi construído através do programa MUSCLE (v3.8.1551) (EDGAR, 2004) e do servidor PAL2NAL (v14) (SUYAMA *et al.*, 2006) seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente (YUE *et al.*, 2017). Árvores filogenéticas de máxima verossimilhança foram construídas com a ferramenta RAxML (v8.2.6) (STAMAKIS, 2014), aplicando testes de inicialização rápida para cada grupo de ortologia um-para-um nas 35 direções, bem como suas sequências concatenadas.

Com base nos grupos de genes de ortólogos obtidos, foi possível obter a proporção compartilhada de genes ortólogos conservados um-para-um para cada comparação par a par desses 35

genomas de fagos. Por exemplo, suponha que o número total de genes do fago A e do fago B seja n_1 e n_2 , respectivamente, e há n_3 genes ortólogos um-para-um compartilhados entre eles. Em seguida, a proporção de genes ortólogos conservados um-a-um foi calculada como $\sqrt{(n_3 * n_3) / (n_1 * n_2)}$. Usou-se a função `dist ()` em R (v3.1) (<https://www.r-project.org/>) para converter essa medida em uma matriz de distância e a função `hclust ()` em R foi aplicada para realizar o agrupamento hierárquico. O pacote R `gplot` (<https://cran.r-project.org/web/packages/gplots/index.html>) foi usado para gerar o *heatmap* com base na matriz de distância e no resultado do agrupamento hierárquico.

3.9 Esporulação e incorporação dos fagos em esporos

Foram empregadas duas metodologias diferentes para induzir o processo de esporulação em células de *Bacillus subtilis* e promover sua interação com os fagos a serem incorporados. Em ambas, o ponto de partida se deu com bactérias cultivadas *overnight* em meio nutritivo TSB.

Método 1

A primeira abordagem utilizada foi baseada em Takashi (1964), com algumas modificações. Após incubação *overnight* em TSB, 10 mL da cultura de *Bacillus subtilis* (ATCC 6051) foram centrifugados a 8000 rpm por 10 min, lavados em Penassay Broth (composição na Tabela 2) e ressuspensos em 12 mL deste mesmo meio com objetivo de atingir uma concentração celular próxima a 10^8 UFC/mL ($DO_{600} = 0,1-0,3$). A cultura foi, então, incubada a 37°C e 160 rpm – etapa de incubação líquida. As amostras foram coletadas em intervalos de tempo previamente determinados e, uma porção de cada, imediatamente submetida à interação com os fagos durante 15 min. A etapa de interação foi realizada em volumes pequenos (entre 1 e 1,5 mL), a 37°C e foram aplicados MOIs 1 e 10 a fim de observar qual resultaria em maior eficiência na incorporação dos fagos aos esporos. Um controle, sem a presença de fagos, foi submetido as mesmas condições e procedimentos.

Tabela 2 Composição do meio Penassay.

Componente	Concentração (g/L)
Extrato de carne	1,5
Extrato de levedura	1,5
Peptona	5,0
Dextrose	1,0
NaCl	3,5
Fosfato de potássio dibásico	3,68
Fosfato de potássio monobásico	1,32

Após etapa de lavagem com água ultrapura e centrifugação a 10.000 rpm por 5 min (repetição de três vezes), as amostras foram ressuspensas em 100 µL de Penassay Broth, plaqueadas em ágar específico para esporulação AK Agar #2 (Arret and Kirshbaum Medium - HIMedia) e incubadas a 37 °C por 24 horas. A incubação das placas é a fase de maturação, para que o processo de esporulação seja completo.

Na sequência, a porção contendo esporos foi coletada da placa e suspensa em 8 mL de uma solução de 0,01M MgSO₄ tampão salino (PBS). Os tubos foram agitados em *vortex* por 5 min, em velocidade média. Após centrifugação a 8.000 rpm por 10 min o *pellet* contendo os esporos foi novamente suspenso em PBS puro e submetido a tratamento com lisozima (100 µg/mL) por 30 min em temperatura ambiente, para promover a lise das células vegetativas remanescentes.

Com o intuito de eliminar fagos livres na solução e qualquer célula vegetativa remanescente, dois procedimentos foram adotados e comparados entre si: lavagem da solução final quatro vezes consecutivas em água ultrapura e ressuspensão em 0.01M MgSO₄ PBS para manutenção dos esporos e a segunda alternativa aplicada foi o tratamento térmico, no qual a solução final foi submetida a uma temperatura de 70 °C por 30 min.

Método 2

A segunda metodologia aplicada para permitir a incorporação dos fagos nos esporos em formação foi adaptada de Sonenshein e Roscoe (1969). Os meios utilizados para induzir a esporulação, conforme sugerido pelos autores, foram o meio basal 121 e sua versão suplementada, 121B (HALL, 1967). A Tabela 3 traz as composições de ambos.

Tabela 3 Composição do meio 121 e suplementação para meio 121B.

Componentes do meio basal 121	Concentração (M)
NaCl	$8,0 \times 10^{-2}$
KCl	$2,0 \times 10^{-2}$
NH ₄ Cl	$2,0 \times 10^{-2}$
Tris	$1,2 \times 10^{-1}$
MgCl ₂	$1,0 \times 10^{-3}$
CaCl ₂	$2,0 \times 10^{-4}$
FeCl ₃	$2,0 \times 10^{-6}$
Na ₂ SO ₄	$2,5 \times 10^{-3}$
ZnCl ₂	$2,0 \times 10^{-6}$
Suplementação para 121B	
Glicose	0,8%
Casamino ácido	0,01%
K ₂ HPO ₄	$1,0 \times 10^{-3}$ M

Após incubação overnight em TSB, 10 mL da cultura foram submetidos a uma "sincronização parcial da população celular" : as células foram coletadas por centrifugação a 8000 rpm durante 10 min, lavadas em meio 121 e ressuspensas em 2,5 mL deste mesmo meio, 2 mL foram utilizados para inocular 8 mL de meio 121B. A cultura foi, então, incubada a 37°C, com agitação de 160 rpm e, após 4 horas repetiu-se o procedimento de “sincronização parcial da população celular” e seguiu-se a etapa de “incubação líquida”.

A coleta das amostras nos diferentes intervalos de tempo de incubação, a interação entre os esporos em formação e os fagos (aplicando-se MOIs variados) e o plaqueamento em AK Agar #2 para a maturação dos esporos foram realizados igual ao Método 1. Nesta segunda metodologia diferentes tempos de maturação foram testados deixando-se as placas em incubação por 24 h, 48 h e 72 h.

As colônias bacterianas foram coletadas das placas e suspensas em água ultrapura refrigerada (aproximadamente 4°C), após 5 min de agitação em *vortex*, centrifugou-se a 4°C, 8000 rpm por 10 min, repetindo-se as mesmas etapas por mais duas vezes. Nas etapas seguintes de purificação utilizou-se protocolo simplificado proposto por Tavares *et al.* (2013). Após a última centrifugação ressuspendeu-se o pellet em solução de 50 mM TRIS-HCl (pH 7.2) com 50 µg/mL de lisozima e incubou-se por 1 hora a 37°C. As amostras foram lavadas em

água ultrapura e, após centrifugação, suspendeu-se em solução de 0.05% (v/v) SDS, agitando-se em vortex por 1min. Em seguida, as amostras passaram por três lavagens sequenciais em água ultrapura. E uma parcela deste produto final foi submetida ao tratamento térmico (70°C por 30 min).

O processo de esporulação foi monitorado (para ambos os métodos) através da observação em microscópio de contraste de fase (Leica DM6000B) de amostras da suspensão de células coletadas durante o processo. A diferença entre células vegetativas, pré-esporos e esporos é evidenciada em função da diferença na intensidade de luz emitida por cada uma destas estruturas.

3.9.1 Determinação da eficiência na incorporação dos fagos aos esporos

Para determinar numericamente a quantidade de esporos produzidos e a eficiência do método na incorporação dos fagos, alíquotas dos diferentes produtos finais foram plaqueadas novamente, após as devidas diluições, desta vez em meio rico em nutriente, para promover a germinação dos esporos.

A partir da mesma amostra aplicou-se o método de double layer agar para contagem das placas de lise geradas e *spread-plate* para contagem das colônias, as quais representam os esporos germinados, neste caso, apenas os que não continham fagos capazes de provocar a lise celular durante o processo de germinação.

A eficiência dos diferentes métodos e suas variações em obter um número satisfatório de esporos contendo o DNA dos fagos de interesse e, ao mesmo tempo sendo capazes de liberá-los mantendo sua capacidade lítica foi calculada através da seguinte equação:

$$E = 100 \times \frac{P}{(P + S)}$$

Sendo,

E = Eficiência na incorporação e liberação dos fagos em esporos (%).

P = Número de placas de lise verificadas nas placas de dupla camada de ágar (UFP/mL)

S = Número de Colônias obtidas usando a técnica de *spread-plate* (UFC/mL)

(P+S) representa o total de esporos presente na amostra, ou seja, aqueles que ao germinar formaram colônias e aqueles que, durante o processo de germinação foram destruídos pela reativação do ciclo lítico do fago.

3.10 Microscopia eletrônica de varredura dos esporos

Os esporos já purificados foram fixados em solução 2,5% de glutaraldeído a 4°C, por 12 h. Após centrifugação e lavagem em PBS, as amostras foram desidratadas em uma série de soluções de etanol a diferentes concentrações (15, 25, 35, 50, 60, 70, 80, 90, 95 e 100%, v/v), sendo mantidas por 45 min, a 4°C, em cada solução.

A etapa de secagem das amostras se deu através do uso do agente químico Hexametildisilazano (HMDS): transferiu-se as amostras da solução de 100% etanol para uma solução 1:2 de HMDS:100% etanol onde ficaram por 20 min, após centrifugação as amostras foram transferidas para uma nova solução de 2:1 de HMDS:100% etanol, na qual ficaram por 20 min. Por fim foram transferidas solução de 100% HMDS por mais 20 min e esta última etapa foi repetida.

A partir desta solução cada amostra foi diretamente depositada em *stubs* de alumínio contendo a fita de carbono adesiva. Após secarem em temperatura ambiente, para que o material biológico passe a ser um condutor térmico e elétrico aceitável, as amostras foram recobertas com uma camada de ~7 nm ouro, sob vácuo usando o equipamento Denton Desk V Sputter System. Devidamente preparadas, as amostras foram analisadas em um microscópio eletrônico de varredura JEOL 6500, a 15 kV.

3.11 Ensaios de indução da germinação dos esporos e liberação dos fagos

Após a ativação térmica em água a 70 °C por 30 min, seguida de resfriamento em gelo, realizou-se os testes de germinação dos esporos suspensos em tampão 25 mM Tris-HCl (pH 7,4) suplementados ou não (controle) com os seguintes germinantes: (a) 20 mM L-alanina (b) 20 mM de cada L-asparagina, D-glucose, D-frutose e K⁺ (mistura denominada AGFK) e (c) 10 mM L-alanina + 10 mM de cada componente de AGFK. A densidade óptica inicial das culturas de esporos foi de 0.8 (DO₆₀₀). A queda na densidade óptica das culturas em processo de germinação foi monitorada pelo leitor de placas (Molecular

Devices, MA). O DO_{600} relativo foi calculado pela divisão de cada leitura (A_t) pela leitura inicial (A_0). Para determinar o tempo latente dos fagos liberados pelos esporos e o padrão de liberação do fago, as amostras foram coletadas em um intervalo de 30 min e imediatamente submetidas a um ensaio de dupla camada de ágar para quantificação dos fagos, após incubação overnight a 30°C.

3.12 Testes de resistência dos fagos livres e fagos incorporados aos esporos

Os fagos PBSC1 e PBSC2 foram submetidos a testes para verificar sua resistência diante de diferentes condições de temperatura, pH e exposição à radiação UV. Os ensaios foram realizados tanto com fagos livres quanto incorporados aos esporos, sendo submetidos às mesmas condições de ensaio. As concentrações iniciais de fagos, em todos os testes, eram em torno de $1,0 \times 10^5$ UFP/mL. A Tabela 4 mostra as informações experimentais compiladas.

Tabela 4 Fatores de estresse ambiental testados e condições aplicadas aos experimentos de resistência dos fagos livres em comparação aos fagos incorporados aos esporos.

Fator	Condições
Calor úmido	Exposição das suspensões de fagos livres (em SMB) e de esporos contendo fagos (em solução PBS), às temperaturas de 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C e 80°C, por 60 min. Os tubos contendo cada amostra foram imersos em banho térmico com temperatura controlada. Amostras foram coletadas a cada 15 minutos.
pH	Fagos livres e esporos contendo fago, foram ambos suspensos em água ultrapura, e os valores de pH foram ajustados com soluções mais ou menos concentradas de HCl e NaOH. O tempo de exposição foi de uma hora para cada valor de pH.
UV	As suspensões de fagos livres em SMB e de esporos em PBS foram irradiados com UV no comprimento de onda correspondente a UVA, em reator protegido da luz, contendo 6 lâmpadas UV (Eiko, Black Light Blue, Shawnee, KS; 18 W m^{-2}) durante 24 horas. Amostras foram coletadas a cada 4 horas.
Cu^{+2}	As amostras foram incubadas durante 1 hora, em temperatura ambiente, em soluções de CuSO_4 com concentrações de Cu^{+2} de 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 e 10,0 ppm.

O impacto destes fatores foi determinado a partir da quantificação das partículas virais viáveis, imediatamente antes e depois da exposição, através do método de dupla camada de ágar.

Para acessar a estabilidade a longo prazo das amostras, soluções estoque de fagos livres (suspensão de fagos em SMB) foram mantidas em temperatura ambiente protegidos da luz. Os esporos carreadores de fagos foram secos ao ar, em temperatura ambiente e posteriormente mantidos nesta mesma condição, protegidos da luz. Ambos foram armazenados desta forma por, no mínimo, 5 semanas e coletas seguidas de plaqueamento foram realizadas a cada 3 ou 4 dias.

3.13 Análise estatística dos dados

Toda análise de dados foi realizada no Origin (OriginLab, Northampton, MA). As barras de erros presentes nos gráficos representam o desvio padrão da média de três valores gerados a partir de experimentos independentes.

O teste de t de Student pareado (dupla cauda) foi utilizado para determinar a significância das diferenças entre os diferentes tratamentos. As diferenças consideradas significativas, a menos que indicado nos resultados, foram aquelas com níveis de confiança de 99% ($P < 0.01$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor entendimento dos resultados obtidos neste trabalho dividiu-se a sessão de Resultados e Discussão em duas partes distintas. A primeira parte é focada no isolamento e caracterização de dois fagos polivalentes – ϕ NA01 e ϕ NA03 – com indicativo de amplo espectro de hospedeiros. Na segunda parte, apresenta-se os resultados da incorporação dos fagos PBSC1 e PBSC2 a esporos de *Bacillus subtilis*, demonstrando-se a viabilidade do uso de esporos como carreadores e protetores para estratégias de *phage delivery*.

PARTE 1: Isolamento e caracterização de fagos polivalentes com indicativos de amplo espectro de hospedeiros

4.1 Isolamento e espectro de hospedeiros dos fagos polivalentes

Isolou-se dois fagos polivalentes através da adaptação da metodologia desenvolvida por Yu *et al.* (2016) de isolamento sequencial por múltiplos hospedeiros em que, durante o processo de seleção, a etapa de enriquecimento do fago foi realizada separadamente, em cada hospedeiro. A separação espacial entre os hospedeiros assegura que fagos mais específicos sejam diluídos e fagos generalistas sejam enriquecidos a cada etapa.

Jensen *et al.* (1998) já haviam reportado um método voltado para o isolamento de fagos polivalentes, aplicando uma técnica de enriquecimento com múltiplas espécies bacterianas simultaneamente, contudo, quando posteriormente aplicado, este método mostrou-se mais eficiente para o isolamento de fagos de diferentes estirpes dentro de uma mesma espécie, mas não para espécies diferentes.

De acordo com Knevezik *et al.* (2009) existem vários motivos pelos quais o uso de um coquetel bacteriano na etapa de enriquecimento não é efetivo para selecionar, verdadeiramente, fagos com amplo espectro de hospedeiros. Entre as razões está a própria competição interespecífica que se dá no meio.

Os fagos isolados através do isolamento sequencial adaptado foram nomeados como ϕ NA01 e ϕ NA03 e possuem indicativo de amplo espectro de hospedeiros (conforme será demonstrado através dos resultados dos ensaios posteriores). Ambos os fagos foram capazes de

infetar tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativa ao mesmo tempo. A ordem de hospedeiros usada no isolamento de cada um segue abaixo:

- *Bacillus subtilis* + *Serratia marcescens* (Hosp 1 + Hosp 2) > *Bacillus cereus* + *Enterobacter asburiae* (Hosp 3 e Hosp 4), para ϕ NA01.
- *Bacillus cereus* + *Serratia marcescens* (Hops 1 + Hosp 2) > *Bacillus subtilis* + *E. coli B* (Hosp 3 e Hosp 4), para ϕ NA03.

Quando se trabalha com fagos polivalentes, capazes de infectar diferentes espécies, tem-se a possibilidade de trabalhar com um hospedeiro de produção, neste caso, escolheu-se o *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* (ATCC 6051) por ser uma espécie não patogênica e de fácil cultivo. A principal vantagem de se ter um hospedeiro de produção é não induzir mecanismos de resistência no hospedeiro alvo (LABRIE *et al.*, 2010). Vários autores já relataram a perda da efetividade de fagos em bactérias após enriquecimento sucessivo com único hospedeiro (FOSTER, 2005; HAMMAD, 1998; PERRY *et al.*, 2009; MCGRATH *et al.*, 1999).

A Tabela 5 apresenta o espectro de hospedeiros dos fagos ϕ NA01 e ϕ NA03 juntamente com o EOP (Eficiência de Plaqueamento) de cada um relativo ao hospedeiro de produção.

Tabela 5 Espectro de hospedeiros e EOP relativo ao hospedeiro de produção dos fagos ϕ NA01 e ϕ NA03.

Bacteria strain	ATCC No.	Gram	EOP* (ϕ NA01)	EOP (ϕ NA03)
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	6051	(+)	1.00	1.00
<i>B. subtilis</i> 168	23857	(+)	0.89	0.83
<i>B. cereus</i> NRS 248	10987	(+)	0.84	0.78
<i>S. marcescens</i> BS303	13880	(-)	0.77	0.72
<i>Enterobacter asburiae</i>	35955	(-)	0.40	0.35
<i>E. coli B</i>	11301	(-)	NA	0.69
<i>E. coli</i> C3000	10798	(-)	NA	0.18
<i>E. coli</i> K-12	15597	(-)	NA	0.35
<i>E. coli</i> NDM-1	BAA2452	(-)	NA	0.24

*Cepas cujo fago em questão não foi capaz de infectar estão marcadas como NA no lugar da eficiência.

O fago ϕ NA01 foi capaz de infectar 5 hospedeiros, enquanto o fago ϕ NA03 tem um espectro de 9 hospedeiros, entre eles, a cepa de *E. coli* NDM-1, resistente a antibiótico.

A capacidade destes fagos infectar tais hospedeiros não relacionados entre si tem profundas implicações ecológicas e evolutivas relacionadas às pressões seletivas que acabam por impedir que esse fago se especialize (MULLER, 1964). Sua ampla infectividade pode resultar da co-evolução do hospedeiro-fago em ambientes com baixa densidade do hospedeiro e alta diversidade (HENDRIX *et al.*, 1999). A co-evolução entre bactérias e fagos tem sido bastante estudada e este processo tem sido vinculado à polivalência de determinados fagos (HALL *et al.*, 2010). No solo, a presença de água é transitória e as comunidades bacterianas apresentam uma grande heterogeneidade espacial (BURROUGHS *et al.*, 2000). Como consequência, a mobilidade e a infecção dos fagos são restritas principalmente devido à falta de água e adsorção não específica em biofilmes ou outras partículas (ABEDON, 2011). Como parasitas obrigatórios, a sobrevivência dos fagos nas comunidades microbianas do solo depende da disponibilidade de seus hospedeiros bacterianos, e a propagação em múltiplos hospedeiros pode maximizar as oportunidades de reprodução em comunidades naturais complexas, aumentando sua capacidade de adequação a esses ambientes.

Experimentos com bactérias e vírus comprovaram que o espectro de hospedeiros pode amplificar-se ao longo do tempo durante a coevolução, quando fagos aumentam sua infectividade ao mesmo tempo que bactérias tendem a aumentar sua resistência, num esforço mútuo de adaptação (POULLAIN *et al.*, 2008).

A partir dos dados da Tabela 5 é possível observar que ambos os fagos mantêm uma alta eficiência de infecção nos hospedeiros, principalmente nas espécies usadas no processo de isolamento, para as quais a menor eficiência é de 0,4 do fago ϕ NA01 em *E. asburiae*.

Autores que também utilizaram método de isolamento de fagos polivalentes por enriquecimento com multi-espécies bacterianas, contudo com uma abordagem diferenciada da adotada neste estudo, relataram que os fagos isolados reduzem em muitas vezes a eficiência de infecção nos hospedeiros alternativos (JENSEN *et al.*, 1998).

Hantula *et al.* (1991) foram pioneiros no isolamento de fagos polivalentes em lodos ativados. Contudo reportaram eficiências dramaticamente baixas quando comparadas entre diferentes hospedeiros (reduções de até 106 vezes).

Raros trabalhos na literatura reportam o isolamento de fagos capazes de infectar bactérias Gram-positivas e Gram-negativas ao mesmo tempo. Khan *et al.* (2002) isolaram 4 bacteriófagos a partir de amostras de lodos ativados com capacidade de infectar estes dois diferentes tipos de bactérias. Contudo, seus estudos foram preliminares e não se aprofundaram na caracterização destes fagos.

Ainda, de acordo com Ross *et al.* (2016) diferentes métodos para determinar o espectro de hospedeiros de um fago, podem gerar resultados diferentes, refletindo os múltiplos mecanismos que as bactérias usam para resistir às infecções virais, assim como as diferentes etapas de infecção que cada método abrange experimentalmente.

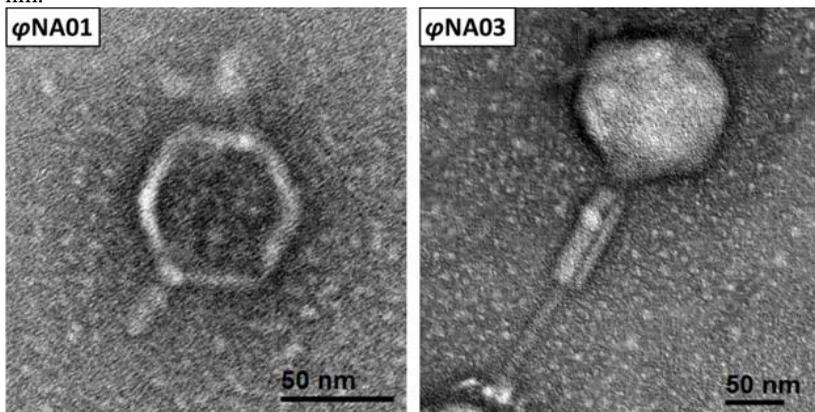
Os resultados obtidos neste trabalho, assim como em outros, em que se utilizam múltiplas estirpes de hospedeiros durante o processo de isolamento demonstram que este tipo de metodologia tem maiores possibilidades de isolar fagos com amplo espectro de hospedeiros. Isto desafia a crença comum de que a maioria dos bacteriófagos são estritamente específicos e destaca-se as implicações disso para várias áreas que são afetadas pelo espectro de hospedeiros, incluindo transferência horizontal de genes e a fagoterapia.

4.2 Caracterização morfológica e do ciclo de vida dos fagos ϕ NA01 e ϕ NA03

Os fagos foram caracterizados conforme sua morfologia, parâmetros de crescimento (relacionados ao ciclo de vida) e composição molecular.

Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (Figura 8) revelaram a morfologia dos fagos ϕ NA01 e ϕ NA03, permitindo classificá-los como pertencentes às famílias *Podoviridae* e *Siphoviridae*, respectivamente.

Figura 8 Imagem dos fagos ϕ NA01 (*Podoviridae*) e ϕ NA03 (*Siphoviridae*) obtida com microscópio eletrônico de transmissão (JEOL 2010) em que os fagos foram corados negativamente com acetato de uranila 2%. Escala de 50 nm.



Ambos os fagos possuem capsídeo icosaédrico, não envelopado e são pertencentes à ordem dos *Caudalovirales*. Enquanto o fago ϕ NA01 possui uma cauda curta, não contráctil e um capsídeo com cerca de 70nm, o fago ϕ NA03 possui cauda longa, também não contráctil e um capsídeo com cerca do dobro de tamanho, 150nm.

Dois ensaios diferentes foram realizados para obter os principais parâmetros do ciclo de vida dos fagos com relação aos seus hospedeiros. Os experimentos foram feitos para cada fago com as quatro cepas bacterianas utilizadas no processo de isolamento, separadamente. A Tabela 6 apresenta os dados referentes a estes parâmetros.

O ensaio de adsorção fornece a constante referente à taxa com que o fago se liga à superfície de cada hospedeiro, medida importante em termos de ecologia do vírus, já que ajuda a estimar o impacto que o fago exerce, enquanto predador, sobre a população bacteriana (KROPINSKI, 2009). Para tanto, assume-se que a adsorção das partículas virais segue uma cinética de primeira ordem. As curvas das cinéticas de adsorção dos fagos ϕ NA01 e ϕ NA03 são apresentadas nas Figuras A1 e A2, em anexo.

A curva de crescimento do fago fornece parâmetros essenciais para entender-se, de forma mais aprofundada, a interação fago/hospedeiro que, por sua vez, colabora no entendimento do impacto

que o fago exerce sobre o ecossistema em que está inserido (MIDDELBOE *et al.*, 2010). A produção de uma descendência do fago (progênie) em função do tempo pode ser descrita por uma curva de crescimento em etapa única, em que o ensaio é conduzido de uma forma que se permite ocorrer apenas um único ciclo de infecção, isto é, não se consideram as reinfeções geradas pelos fagos produzidos durante o ensaio.

Originalmente desenvolvido por Ellis & Delbrück (1939), o experimento que gera a curva de crescimento em etapa única mede o período latente e o *burst size* de um determinado fago em um determinado hospedeiro.

O período latente caracteriza-se pela acumulação intracelular de fagos, é o período mínimo de tempo que leva desde a adsorção dos fagos a uma célula hospedeira até a lise do hospedeiro com liberação da progênie do vírus. Alguns autores também o abordam como “tempo de lise”. *Burst size* é o número médio de fagos libertados por célula hospedeira infectada e está ligado à fecundidade do fago (ACKERMANN, 1999).

Tabela 6 Constante de adsorção, período latente e *burst size* dos fagos ϕ NA01 e ϕ NA03 relacionados a cada um dos hospedeiros de isolamento.

Fago	Hospedeiro	Constante de adsorção k (ml/min)	Período latente min	Burst size UFP/Cel
ϕNA01	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	$1,82 \times 10^{-09}$	40	120
	<i>B. cereus</i> NRS 248	$6,44 \times 10^{-10}$	40	100
	<i>E. asburiae</i>	$9,13 \times 10^{-10}$	40	102
	<i>S. marcescens</i> BS303	$4,41 \times 10^{-10}$	40	100
	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	$5,75 \times 10^{-10}$	50	100
ϕNA03	<i>B. cereus</i> NRS 248	$5,32 \times 10^{-10}$	50	90
	<i>E. coli</i> B	$4,92 \times 10^{-10}$	40	110
	<i>S. marcescens</i> BS303	$4,13 \times 10^{-10}$	50	100

A constante de adsorção de ϕ NA01 ficou entre 4.41×10^{-10} e 1.82×10^{-9} ml/min e a de ϕ NA03 variou entre 4.13×10^{-10} e 5.75×10^{-10} ml/min sendo o valor mais elevado relacionado ao hospedeiro de produção para ambos os vírus. A maioria destes valores está abaixo daqueles típicos encontrados em fagos com espectro de hospedeiros restrito, como é o caso de alguns já bastante estudados, dentre eles o T4 ($2,4 \times 10^{-9}$ ml/min) (HEINEMAN *et al.*, 2008), T7 ($2,0-4,0 \times 10^{-9}$ ml/min) e λ ($1,3-9,9 \times 10^{-9}$ ml/min) (KASMAN *et al.*, 2002). Por ser polivalente, é possível que os fagos isolados tenham mecanismos de ligação aos receptores celulares diferenciados de fagos monovalentes, o que implica em uma velocidade de adsorção mais baixa.

Além disso, um grande número de fatores, incluindo o estágio de crescimento celular, presença de sais (particularmente íons divalentes), compostos orgânicos, agitação, temperatura, tamanho celular e densidade dos receptores de superfície na célula hospedeira influenciam no valor da constante k (DELBRUCK, 1940; ADAMS, 1959).

O *burst size* e o tempo latente, por sua vez, sofrem grande influência conforme o tipo de hospedeiro e sua taxa de crescimento específico, a composição do meio de crescimento e a temperatura de incubação (CAREY- SMITH *et al.*, 2006).

O *burst size* do fago ϕ NA01 varia entre 102 e 120 PFU, conforme cada hospedeiro, por célula infectada. Este valor está um pouco abaixo da maioria encontrada na literatura para fagos com as mesmas características moleculares – fagos do tipo N4 (informações obtidas a partir do sequenciamento do genoma, apresentadas na sessão 4.3). Contudo, existe uma extensa variabilidade entre os *burst size* dos fagos do mesmo tipo já reportados, com relatos de 150 PFU (FOUTS *et al.*, 2013) até 9000 PFU (MA *et al.*, 2016).

O *burst size* de ϕ NA03 é ainda menor variando entre 90 e 110 PFU por célula infectada. Estes valores são similares com os de outros fagos com amplo espectro de hospedeiros interspecíficos, cujos *burst size* são inferiores a 100 PFU por célula infectada (YU *et al.*, 2016; PANTUCEK *et al.*, 1998).

As Figuras 9 e 10 apresentam os gráficos gerados pelos ensaios de *one step growth curve* dos fagos ϕ NA01 e ϕ NA03, respectivamente.

Figura 9 Curvas de crescimento em etapa única do fago ϕ NA01 realizada para cada um dos hospedeiros de isolamento, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter asburiae* e *Serratia marcescens*, conforme indicado em cada gráfico.

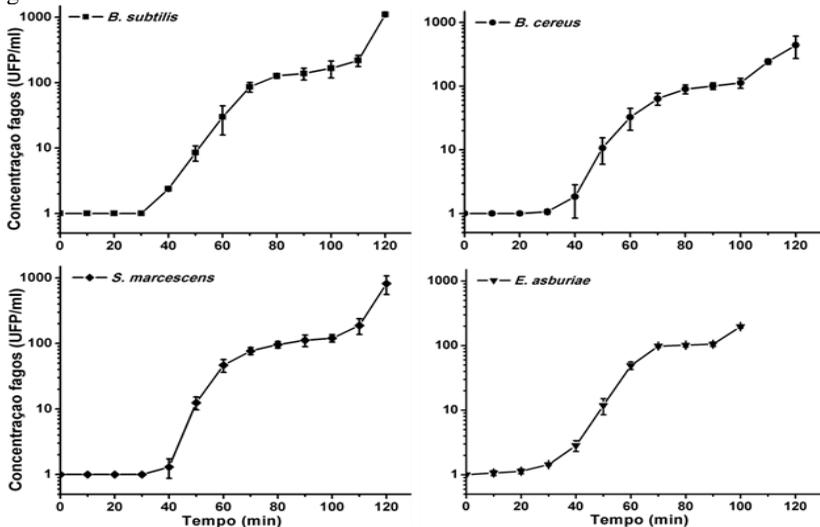
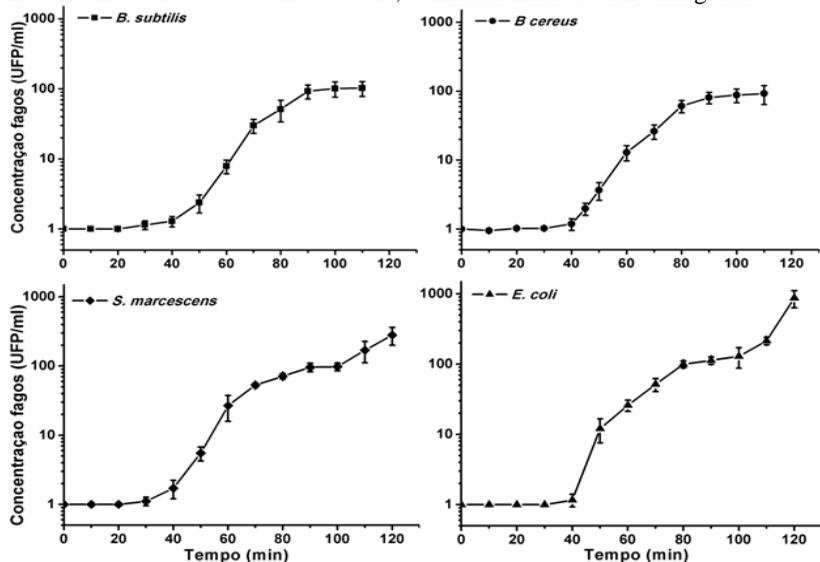


Figura 10 Curva de crescimento em etapa única do fago ϕ NA03 realizada para cada um dos hospedeiros de isolamento, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Serratia marcescens*, conforme indicado em cada gráfico.



Wang *et al.* (2006) afirmam que o tempo de lise tem impacto direto sobre o desempenho do fago e por isso existe um “tempo de lise ideal”, ou seja, um fago com um período latente muito longo, teria um *burst size* elevado, contudo perde a oportunidade de provocar novas infecções. Por outro lado, um fago com um tempo de latência mais curto, infecta com maior rapidez as outras células hospedeiras presentes no ambiente, mas reduz uma progênie menor a cada infecção. Portanto, é o equilíbrio entre estes parâmetros que irá resultar em uma taxa de crescimento ótima para o fago.

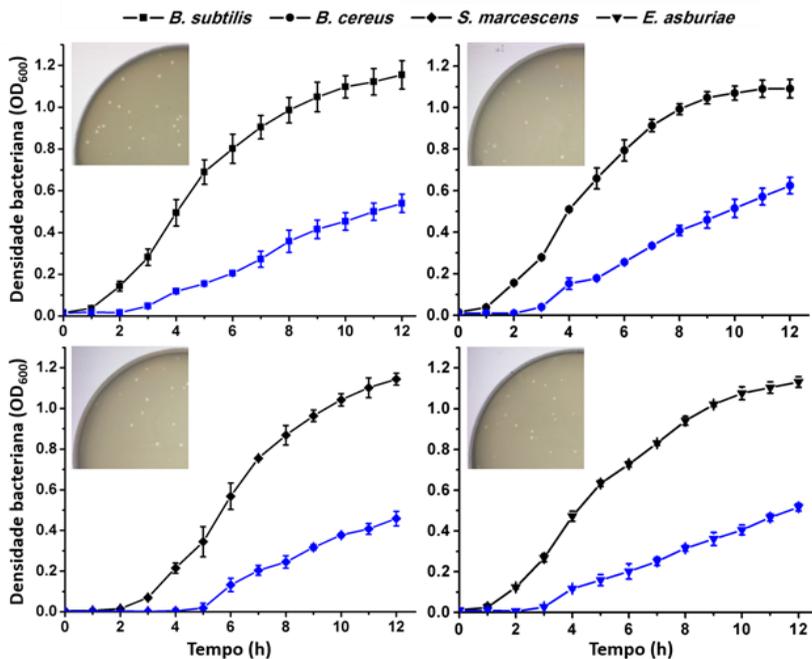
Chibany-chenouffi *et al.* (2004) também chamam atenção para o fato de que, em experimentos laboratoriais, geralmente trabalha-se com condições ótimas de crescimento da bactéria, enquanto num ambiente aquático natural, é comum os microrganismos conviverem com condições de limitação de nutrientes ou fatores físicos desfavoráveis. Consequentemente, o *burst size in situ* tende a ser menor do que aquele determinado em laboratório e é importante levar esse fator em consideração quando da aplicação do fago para controle microbiano.

4.3 Caracterização extra da interação do fago ϕ NA01 com os hospedeiros.

Realizou-se experimentos adicionais de caracterização do fago ϕ NA01 com intuito de aprofundar-se o entendimento a respeito da polivalência dos fagos estudados a partir da sua interação com os hospedeiros.

A Figura 11 apresenta as curvas de crescimento bacteriano regulares e na presença do fago ϕ NA01, em meio nutritivo líquido. O MOI inicial dos ensaios com fago foi de 10. Cada painel também traz a imagem da placa do ensaio de dupla camada de ágar (fago numa concentração de, aproximadamente, 1×10^3 UFP/mL), demonstrando que o espectro de hospedeiros deste fago é confirmado tanto pelo ensaio de plaqueamento quanto pelo ensaio em batelada líquida.

Figura 11 Efeito inibitório do fago ϕ NA01 sobre os hospedeiros de isolamento. As curvas de crescimento contendo bactérias e o fago estão em azul e curvas em preto são o controle. A imagem das placas mostra o resultado de ensaios de dupla cama de ágar.



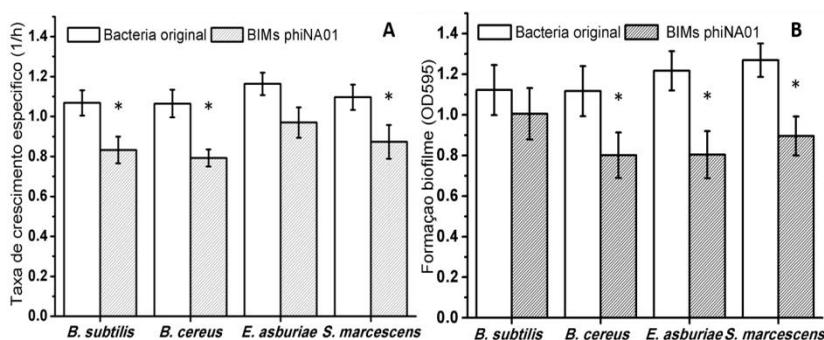
Ao ser adicionado em culturas líquidas puras dos hospedeiros, o fago ϕ NA01 reduziu significativamente o crescimento das bactérias quando comparado às culturas controle. O efeito inibitório promovido com MOI 10 foi observado ao longo das 12 horas de incubação, com pouca variação entre os hospedeiros. Este resultado sugere que o fago ϕ NA01 tem potencial para ser aplicado como agente de controle biológico atuando na inibição do crescimento de qualquer uma dessas cepas bacterianas.

Quando qualquer cepa bacteriana sensível a determinado fago virulento é exposta a ele é natural que, eventualmente, surjam mutantes desta mesma cepa insensíveis ao fago em questão (LABRIE *et al.*, 2010). No entanto, o desenvolvimento de resistência ao fago por parte do hospedeiro, geralmente implica em uma queda no desempenho da bactéria. O termo usualmente empregado para avaliar o desempenho das

bactérias resistentes é “*fitness cost*” e está associado a mudanças nas taxas de crescimento específico e à capacidade de formação de biofilme.

Avaliou-se a frequência de surgimento de bactérias mutantes insensíveis a infecção (BIMs) pelo fago ϕ NA01 para cada hospedeiro de isolamento assim como o *fitness cost* implicado na mutação de cada uma das cepas (Figura 12).

Figura 12 *Fitness cost* das bactérias mutantes insensíveis ao fago ϕ NA01. As bactérias mutantes que demonstraram resistência ao fago ϕ NA01 foram testadas em termos de taxa de crescimento específico (A) e habilidade de formação de biofilme (B). Os asteriscos (*) representam diferença significativa ($p < 0,01$).



A frequência de surgimento de bactérias mutantes resistentes ao fago ϕ NA01 foi de $2,9 \pm 0,2 \times 10^{-5}$, $1,5 \pm 0,4 \times 10^{-5}$, $1,6 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ e $5,0 \pm 0,5 \times 10^{-5}$ para *B. subtilis* subsp *subtilis*, *B. cereus* NRS248, *S. marcescens* BS303 e *E. asburiae*, respectivamente.

Apesar destes valores serem maiores que a maioria daqueles já reportados na literatura, a frequência de surgimento de BIMs não parece ter relação direta com espectro de hospedeiros do fago. Existem relatos de fagos com espectro de hospedeiros limitado, ambos infectando o mesmo hospedeiro, nas mesmas condições experimentais, cujas frequências surgimento de BIMs são de $2,5 \times 10^{-4}$ e $1,3 \times 10^{-6}$ (GARCIA *et al.*, 2007), ou seja, bem diferentes entre si. O'Flynn *et al.* (2004) também encontraram valores de $1,2 \times 10^{-6}$ e $3,3 \times 10^{-4}$ para dois fagos altamente específicos em relação a uma cepa de *E. coli*. Gutiérrez *et al.* (2015) relataram frequências bastante baixas (4,05 a $1,1 \times 10^{-7}$), valores próximos ao encontrado para *E. coli* com o fago T7 ($6,2 \times 10^{-7}$). Na presença do fago polivalente PEF1 a frequência de surgimento de

resistência da cepa de *E. coli* K-12 foi de 3.8×10^{-6} (YU *et al.*, 2017b), valor menor em relação ao fago ϕ NA01 e a alguns fagos monovalentes mencionados.

Mediu-se a taxa de crescimento específico durante a fase de crescimento exponencial e nota-se, claramente, que houve uma redução quando se comparam os BIMs com as cepas originais. Observou-se a maior redução, de 25,6% na velocidade específica de crescimento, para *B. cereus*, enquanto para *E. asburiae* a velocidade específica de crescimento foi de $1,16 \text{ h}^{-1}$ para a linhagem original e $0,97 \text{ h}^{-1}$ para a linhagem mutante, representando a menor redução entre as bactérias testadas, aproximadamente 17%. *B. subtilis* e *S. marcescens* tiveram um decaimento de 22% e 20,3%, respectivamente.

A formação do biofilme foi medida após 24h de incubação e indicou que os fenótipos resistentes aos fagos exigem maior *fitness cost* do que as linhagens selvagens. A medição da absorbância (DO_{595}) revelou que *B. subtilis* diminuiu de $1,12 \pm 0,12$ para $1,0 \pm 0,13$, *B. cereus* de $1,17 \pm 0,14$ para $0,8 \pm 0,11$, *S. marcescens* de $1,27 \pm 0,08$ para $0,89 \pm 0,1$ e *E. asburiae* de $1,22 \pm 0,10$ para $0,80 \pm 0,12$, resultando em reduções de 11,0%, 32%, 30,0% e 34%, respectivamente.

A aquisição de resistência por parte dos hospedeiros é, em geral, uma preocupação na aplicação de fagos para controle microbiano, já que pode comprometer a eficácia do tratamento (ORMALA & JALASVUORI, 2013). Por isso, uma baixa frequência de surgimento de BIMs é desejada. No entanto, de acordo com Gutiérrez *et al.* (2015), devido às características adquiridas pelas cepas resistentes que dificultam sua adaptação e desempenho no crescimento (maior *fitness cost*) tornando-as, conseqüentemente, menos estáveis, a sensibilidade ao fago acaba sendo recuperada em fenótipos de gerações futuras.

Alguns autores defendem que o uso de coquetéis de fagos podem ser a solução para mitigar o surgimento de BIMs. Gu *et al.* 2012 usaram as cepas isoladas originais e, consecutivamente, variantes resistentes aos fagos como bactérias hospedeiras para isolar fagos de *Klebsiella pneumoniae*. O coquetel de fagos desenvolvidos a partir destes isolados não apenas apresentou um amplo espectro de hospedeiros, mas também assegurou que bactérias resistentes a um fago permanecessem suscetíveis a outro. Sendo a frequência de surgimento de BIMs após tratamento com coquetel ($7,5 \times 10^{-7}$ CFU / mL)

significativamente menor em comparação com o tratamento com um único fago ($9,5 \times 10^{-4}$ - $3,0 \times 10^{-5}$).

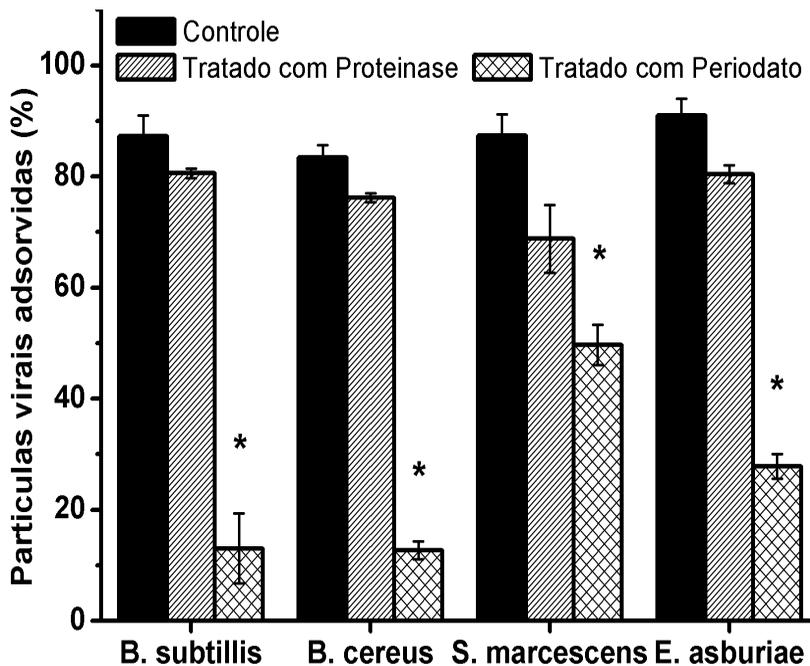
Outra análise que pode se revelar importante no entendimento da variedade no espectro de hospedeiros dos fagos é a identificação do receptor molecular ao qual o fago se adsorve na superfície da bactéria.

O processo de infecção de um fago se inicia com sua adsorção à superfície bacteriana. Para que esta primeira etapa ocorra, é necessário o reconhecimento dos receptores na superfície bacteriana pelas proteínas de ligação ao receptor (PLR) do fago, as quais geralmente se encontram nas extremidades das fibras da cauda. A interação entre as PRL e a molécula à qual se acoplam na superfície do hospedeiro é altamente específica e determina o espectro de hospedeiros de um fago (HYMAN & ABEDON, 2010).

Os receptores potenciais incluem proteínas e polissacarídeos presentes na superfície celular e o grau de afinidade do fago com seu hospedeiro depende, em grande parte, da abundância e natureza destes receptores (RAKHUBA *et al.*, 2010).

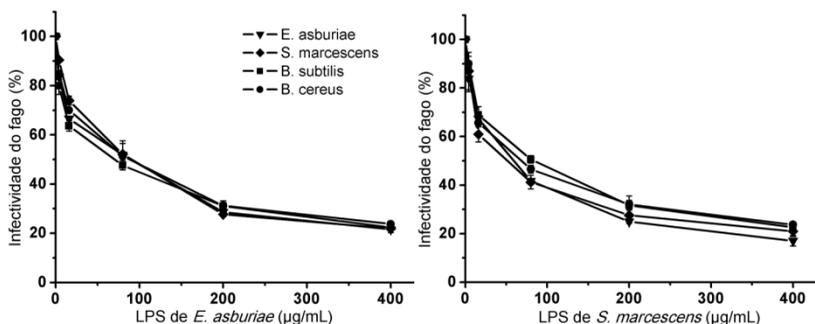
Os ensaios de adsorção de ϕ NA01 utilizando *B. subtilis*, *B. cereus*, *E. asburiae* e *S. marcescens* tratados com periodato (removendo o polissacarídeo de superfície) apresentaram todos uma redução significativa ($p < 0,01$, $n = 6$) na adsorção do fago (Figura 13) à superfície bacteriana. Em contraste, ensaios de adsorção do fago realizados após tratamento das bactérias com proteinase K (digerindo proteínas da superfície celular) tiveram resultados de adsorção bastante próximos aos dos ensaios realizados com as bactérias controle, ou seja, sem tratamento com periodato ou proteinase K. Estes resultados tornam quase nula a probabilidade de que uma proteína seria o receptor celular ao qual o fago se liga e sugerem que é um polissacarídeo a molécula que serve como receptor para ϕ NA01 em todos os hospedeiros testados.

Figura 13 Determinação dos receptores de fagos na superfície bacteriana através da taxa de adsorção após tratamento com proteinase K e periodato em comparação com culturas não tratadas (controle). Os asteriscos (*) representam diferença significativa ($p < 0,01$).



Os lipopolissacarídeos (LPS) formam a camada lipídica externa das bactérias Gram-negativas e foram identificados como sendo receptores para fagos mais comuns de *Enterobacteria* (por exemplo, T3, T4 e T7) (RAKHUBA *et al.*, 2010). Ao incubar-se o fago ϕ NA01 com os LPS extraídos de *S. marcescens* e *E. asburiae* e, posteriormente, estimular a infecção dos hospedeiros, observou-se uma inibição significativa da infectividade de ϕ NA01 contra todos os hospedeiros (Figura 14).

Figura 14 Perda de infectividade do fago ϕ NA01 nos diferentes hospedeiros após incubação do fago com lipopolissacarídeos (LPS) extraídos dos hospedeiros Gram-negativos *S. marcescens* e *E. asburiae*.



Este resultado sugere que, durante a interação do fago com o LPS, estas moléculas se ligam às PLR dos fagos, impedindo que ele seja adsorvido na superfície dos hospedeiros posteriormente. Além disso, é possível concluir que o ϕ NA01 utiliza o mesmo PLR para reconhecer polissacarídeos de estrutura semelhante nos hospedeiros Gram-negativos e nos Gram-positivos. Bactérias Gram-positivas não possuem uma membrana externa e LPS, mas Schäffer *et al.* (1996) correlacionaram os glicanos (cadeias de oligossacarídeos) da camada glicoproteica dessas bactérias com a estrutura dos antígenos O dos LPS. Os glicanos, portanto fornecem, potencialmente, um revestimento de carboidratos semelhante ao encontrado em Bactérias Gram-negativas. Isso pode ajudar a explicar como o fago ϕ NA01 tem como alvo essas bactérias tão distantes estrutural e evolutivamente.

Em função dos glicanos da camada S estarem ligados a proteínas de superfície, a digestão com proteinase K poderia ter prevenido a infecção adsorção e consequente infecção do fago nas bactérias Gram-positivas tratadas. No entanto a infecção pelo fago continuou viável, representando uma possível limitação para esta hipótese. Cabe ressaltar que existem grandes diferenças na susceptibilidade das proteínas da superfície celular à degradação por protease (VOSS *et al.*, 2014), e seria esperado que a glicação ajude a proteger estas proteínas da clivagem.

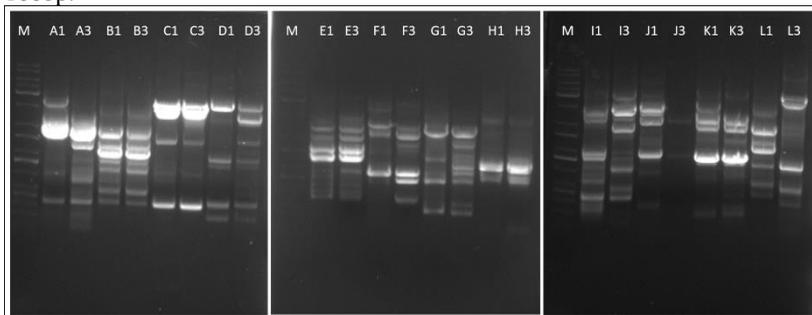
4.4 Caracterização molecular dos fagos

A falta de um marcador genético comum entre os vírus acaba por dificultar a melhor elucidação de áreas como a caracterização da diversidade, genética de populações e variações das associações virais naturais, deixando uma lacuna no conhecimento das comunidades virais (ROHWER e EDWARDS, 2002).

O RAPD PCR é comumente usado para tipificação de cepas bacterianas isoladas ou para comparação de comunidades bacterianas inteiras (FRANKLIN *et al.*, 1999). Neste trabalho a técnica foi utilizada como uma forma de garantir que os fagos ϕ NA01 e ϕ NA03 são diferentes entre si, comparando sua diversidade genotípica.

Os produtos do RAPD-PCR realizados individualmente com os 13 *primers* selecionados foram submetidos a gel eletroforese e o padrão de bandas gerado é apresentado na Figura 15.

Figura 15 Padrão de bandas dos produtos de RAPD PCR para ϕ NA01 (1) e ϕ NA03 (3) utilizando 13 primers distintos (A) P1; (B) P2; (C) Op-B03; (D) Op-C02; (E) OPA-6; (F) OPA-9; (G) OPA-13; (H) CRA-23; (I) Op-C05; (J) Op-C13; (K) Op-E07; (L) RAPD5. A letra M designa o marcador molecular de 100bp.

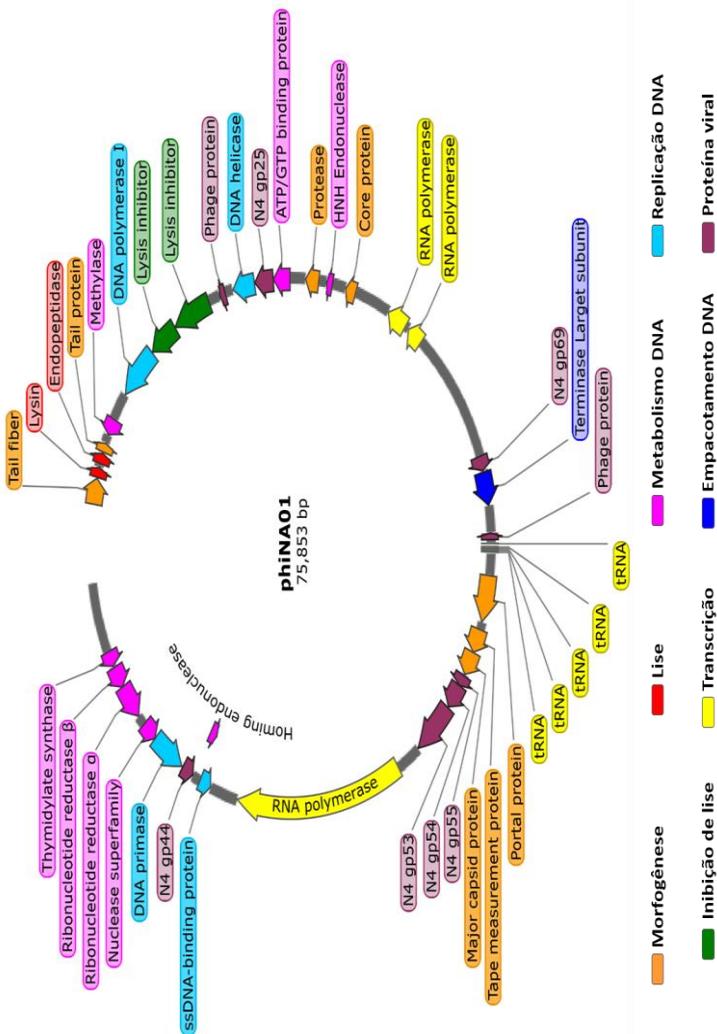


Os padrões obtidos pela técnica de RAPD revelaram que os fragmentos amplificados variaram entre 100 pb e 1 kb, com a quantidade de bandas polimórficas variável conforme o *primer* e alguns padrões bastante diferenciados entre ϕ NA01 e ϕ NA03. No total dos 13 padrões de polimorfismo gerados para cada fago, apenas 5 se apresentaram idênticos ou muito parecidos.

O sequenciamento genômico do fago ϕ NA01 revelou que ele é composto por 75.853 pb de DNA de fita dupla distribuídas em 93 ORFs e contendo 44.47% dos pares GC. Averiguou-se uma estrutura do tipo mosaico, o que reflete níveis elevados de troca genética por transferência horizontal ao longo de sua evolução (HATFULL, 2008).

O mapa apresentado na Figura 16 traz as principais ORFs anotadas após sequenciamento e divididas em módulos funcionais. As demais ORFs que não constam no mapa, foram anotadas como proteínas hipotéticas. A Tabela A2 do Anexo traz todas as ORFs anotadas em sequência, incluindo o início e fim de cada sequência do fragmento e a Tabela A3 traz as sequencias referentes aos RNAt.

Figura 16 Mapa genômico do fago ϕ NAO1 e representação da organização funcional das ORFs. A direção das setas representa a direção de transcrição. As ORFs foram classificadas em módulos, por cores, de acordo com cada função do gene prevista.



Menos da metade do total de ORFs do fago ϕ NA01 possui seqüências genéticas conhecidas e passíveis de serem anotadas funcionalmente. Esta característica é bastante normal no sequenciamento de fagos que, apesar de serem extremamente populosos, e o número de sequenciamentos de diferentes indivíduos ter aumentado geometricamente de alguns anos para cá, ainda existem muitas lacunas quanto a sua diversidade genética. Ainda, segundo Sime-Ngando (2014) a falta de genomas de fagos de referência adequados em bancos de dados é um obstáculo fundamental à sua integração em estudos de ecologia microbiana de referência, apesar da importância ecológica dos vírus.

Em geral, os genomas de fagos são drasticamente menores que das bactérias homólogas a eles, em função disso, assume-se que apenas genes fundamentais para sua sobrevivência e replicação são mantidos ao longo de sua evolução (WAGEMANS *et al.*, 2014).

Com base na anotação do genoma o fago ϕ NA01 foi considerado como um fago do gênero N4. Este é um fago lítico de referência, membro da família *Podoviridae*, possui DNA de fita dupla e infecta cepas de *E coli* K12. Os vírus do tipo N4 são foco de interesse especial em função das características únicas de seu genoma e estratégias de propagação (ZHAN *et al.*, 2015).

O fago N4 é um dos poucos conhecidos até o momento que não depende da atividade da RNA polimerase de seu hospedeiro para transcrição de seus genes (ROTHMAN & SCHITO, 1974), já que possui a RNA polimerase viral (RNAP_v) codificada em seu genoma. São pelo menos três genes que codificam esta proteína que se diferenciam pela transcrição de genes em diferentes estágios do ciclo de vida do fago (GARCIA *et al.*, 2013).

Dividiu-se o genoma do fago ϕ NA01 em sete módulos funcionais: morfogênese do fago, metabolismo do DNA, replicação do DNA, transcrição do DNA, empacotamento do DNA, inibição de lise e lise do hospedeiro. Um oitavo grupo cujos genes puderam ser distinguidos como similares ao fago N4, mas as funções ainda não claramente definidas, foi classificado como “proteína viral”.

A RNA polimerase viral torna os fagos do gênero N4 únicos entre os vírus com DNA de fita dupla, uma vez que não depende da

atividade da RNA polimerase do hospedeiro. Encontrou-se três ORFs compatíveis com unidades de RNA polimerase codificadas no genoma do fago ϕ NA01, incluindo a RNA polimerase viral de 10,6 Kbs (ORF 79), a qual é injetada juntamente com o DNA viral na bactéria para iniciar a transcrição precoce, independente dos mecanismos de transcrição do hospedeiro (DAVYDOVA *et al.*, 2009). Já se reportou que a presença destas RNA polimerases também podem aumentar a tolerância e a capacidade de replicação do fago em algumas condições ambientais mais severas, por exemplo, baixa temperatura e alta salinidade (ZHAN *et al.*, 2015; MURAKAMI *et al.*, 2008).

Um aglomerado de cinco sequências pequenas codificando o RNAt completa o módulo de transcrição de ϕ NA01. A presença dos RNAt indica um outro ponto de independência de fago em relação ao hospedeiro uma vez que, após sua entrada na célula, não necessita do RNAt dos hospedeiros com estas especificidades para a sua síntese proteica. A presença de RNAt pode desempenhar um papel importante no vasto espectro de hospedeiros do fago ϕ NA01. De acordo com Enav *et al.* (2012), o fato de fagos carregarem genes de RNAt pode ser uma estratégia para expandir seu repertório de hospedeiros potenciais. Poucos fagos têm sequências de códons que combinam perfeitamente com seus hospedeiros, além disso, diferenças no conteúdo genômico G + C entre eles poderiam representar uma barreira para uma infecção bem sucedida. Para superar esta limitação, muitos fagos codificam alguns RNAt extras, particularmente acomodando aqueles que são mais ricos em pares AT.

As proteínas classificadas no grupo “Metabolismo do DNA” são responsáveis pela regulação de enzimas envolvidas no metabolismo ou replicação do DNA.

Como parte do módulo de metabolismo do DNA, o ORF 8 codifica uma adenina metilase de reparo do DNA. Essa proteína, rara entre os vírus do gênero N4, pode protegê-los contra alguns sistemas de restrição do hospedeiro (WITTMANN *et al.*, 2015). Krüger e Bickle (1983) correlacionaram o processo de metilação em fagos que infectam o gênero *Bacillus* com a possibilidade de se expandir e diversificar o espectro de hospedeiros. A capacidade destas enzimas para reconhecer mais do que uma única sequência alvo pode fornecer um fago particular com imunidade a vários sistemas de modificação de restrição bacteriana (MURPHY *et al.*, 2013).

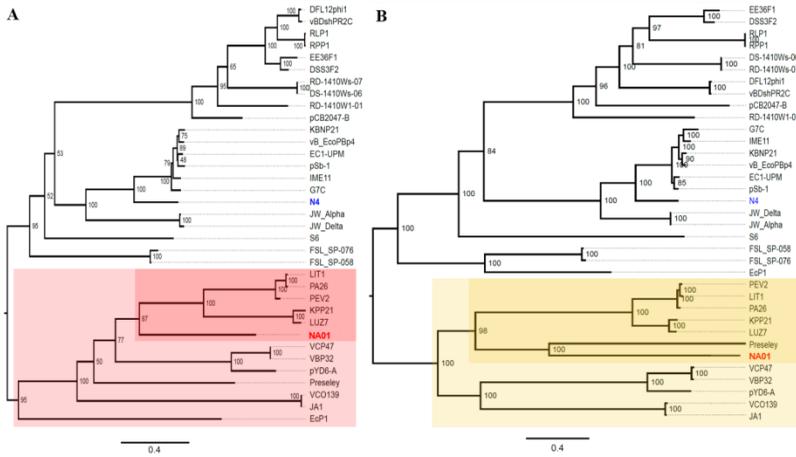
Um total de cinco proteínas codificadas fazem parte do grupo de morfogênese viral as proteínas da cauda (ORF 5), proteínas do core (ORF 33), proteína portal (ORF70), *tape measure* proteína (ORF 72) e proteína principal do capsídeo (ORF 73). Embora as proteínas “*tape measure*” desempenham papel fundamental nas famílias *Myoviridae* e *Siphoviridae*, onde são usadas como uma espécie de armação para a montagem da cauda (GARCIA *et al.*, 2013), não são tão difíceis de serem encontradas em *Podoviridae*s, como é o caso de ϕ NA01.

Conforme já mencionado, não existe um marcador universal para fagos que possa ser usado com confiabilidade para comparar afinidade filogenéticas entre eles, como no caso das bactérias que possuem o gene rRNA 16S. Atualmente, têm-se usado alguns marcadores específicos para grupos taxonômicos menores. O gene que codifica a proteína portal tem sido bastante utilizado por pesquisadores para *Caudovirales*. Esta proteína fica localizada no topo do pescoço do fago, através da qual o DNA passa em direção à base da cauda (CLOCKIE *et al.*, 2011).

A proteína terminase é responsável pelo controle do empacotamento do DNA e, em geral, é altamente conservada quando comparada a outras regiões do genoma de um fago. Apenas a subunidade maior desta proteína foi identificada (ORF 65) entre as sequências do genoma do fago ϕ NA01 que, provavelmente, utiliza os mesmos mecanismos de empacotamento de DNA que outros fagos tipo N4. Sequências que codificam estas proteínas também têm adquirido papel importante por serem utilizadas em relações filogenéticas e para decifrar relações evolutivas entre os fagos pertencentes a diferentes famílias (CASJENS *et al.*, 2005).

A Figura 17 traz os dendogramas resultantes da análise filogenética das proteínas terminase e RNA polimerase do fago ϕ NA01 juntamente com outros 34 membros da família N4, incluindo o próprio fago N4.

Figura 17 Análise filogenética dos fagos da família N4 utilizando (A) Terminase (B) vRNA polimerase.



As linhas horizontais, neste caso, são ramificações e representam linhagens evolutivas mudando com o tempo. Quanto maior o ramo na dimensão horizontal, maior a quantidade de transformações ao longo do tempo. A barra na parte inferior da figura (0,4) fornece a escala para isso. As unidades de comprimento do ramo são, normalmente, relativas a substituições de nucleotídeos por sítio, dadas em porcentagem de mudança, ou seja, o número de alterações a cada 100 sítios de nucleotídeos.

Analisando-se a árvore filogenética da terminase, dois grandes grupos são observados, sugerindo a história evolutiva desses fagos. Enquanto a terminase do próprio fago N4 está entre as mais conservadas, a do fago ϕ NA01, que tem a maior similaridade com as dos fagos LIT1, LUZ7, PEV2, KPP21 e PA26 de *Pseudomonas*, pertence ao grupo com maior diferenciação de sequência.

A análise filogenética da sequência que codifica a proteína RNA polimerase revelou que, diferentemente da terminase, a RNA polimerase é relativamente menos conservada entre todos os fagos do gênero N4. A estrutura apresenta pelo menos três grupos principais e o ϕ NA01 está, novamente, mais próximo dos fagos de *Pseudomonas*,

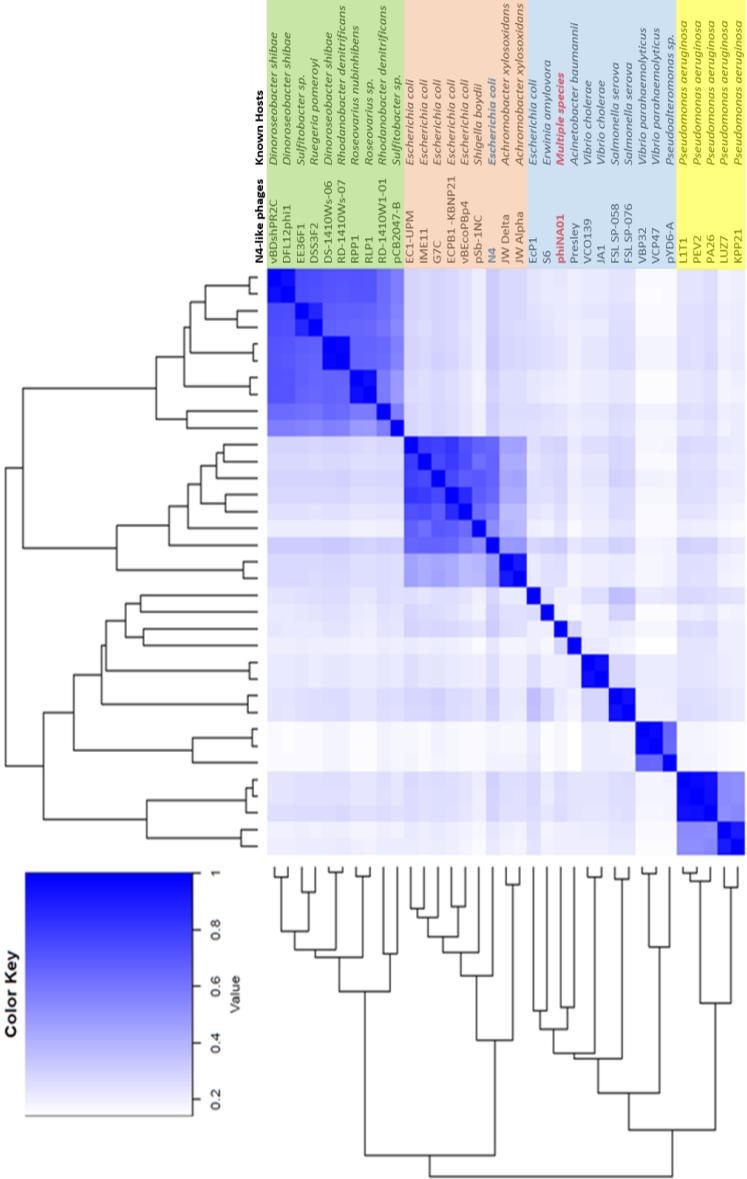
embora compartilhe 100% de identidade de sequência de nucleotídeos de vRNA polimerase com o fago Presley que infecta *Acinetobacter*.

As árvores baseadas nos genes da fibra da cauda e da lisina parecem ser impossíveis de construir de forma significativa, uma vez que a maioria dos seus genes ortólogos de outros fagos não pode ser identificada de forma confiável, sugerindo baixa similaridade entre sequências para esses dois genes em todos os fagos do grupo.

Atualmente, existem cerca de 43 membros publicados do gênero N4 e todos possuem hospedeiros que pertencem à *Proteobacteria*. (ZHAO *et al.*, 2009; WITTMANN *et al.*, 2014; CEYSSENS *et al.*, 2010), ϕ NA01 é o primeiro capaz de infectar um filo diferente, os *Firmicutes*.

Com o uso de ferramentas de software adequadas, realizou-se a comparação dos genomas completos do fago ϕ NA01 e os demais do gênero N4 sequenciados, distribuindo na forma de matriz e gerando a tendência diagonal que representa altos níveis de identidade de sequência de DNA. O *heatmap* é gerado com base no número de grupos de genes ortólogos compartilhados por fagos (Figura 18).

Figura 18 Matriz de similaridade de 35 fagos da família N4. Quanto mais escuro o tom de azul mais próxima a relação evolutiva entre indivíduos.



As análises geradas a partir da montagem do *Heatmap* mostram que os fagos deste gênero podem ser classificados em quatro grupos principais. A relação evolutiva entre os fagos em cada grupo está mais correlacionada com a especificidade do hospedeiro. O fago ϕ NA01 possui uma organização genômica relativamente distinta dos demais fagos do gênero N4, embora tenha semelhanças estreitas com o fago Presley, um fago isolado a partir do esgoto (FARMER *et al.*, 2013). O grupo ao qual ϕ NA01 pertence dentro da matriz pode ser considerado um grupo distinto dos demais do gênero. Fagos relacionados a esse grupo foram isolados de ambientes muito distintos e possuem hospedeiros evolutivamente distantes, o que pode explicar a falta de relação entre si e com os demais grupos na matriz de similaridade. É importante destacar que nenhum desses fagos é considerado capaz de infectar mais de uma espécie de bactéria.

Existe um consenso entre os virologistas de que as subdivisões dos fagos do tipo N4 abaixo do nível do gênero não são satisfatoriamente claras (CHAN *et al.*, 2014). Alguns consideram, inclusive, que o grupo N4 pertence a uma divisão taxonômica mais alta que um gênero e propuseram uma reavaliação taxonômica (WITTMANN *et al.*, 2015).

A conservação dos elementos centrais envolvidos na transcrição, replicação do DNA e morfologia do vírus estão diretamente relacionados ao sucesso evolutivo dos fagos do gênero N4 (FOUTS *et al.*, 2013). Enquanto ϕ NA01 tem as regiões de DNA mais conservadas entre as proteínas estruturais com um grupo de morfogênese mais próximo dos outros fagos semelhantes a N4, as proteínas relacionadas ao reconhecimento do hospedeiro são as mais distantes, principalmente porque a maioria dos isolados não tem fibras específicas gene identificado.

PARTE 2: Incorporação de fagos polivalentes aos esporos de *Bacillus subtilis*

Para os experimentos de incorporação de fagos aos esporos de *Bacillus subtilis* utilizou-se dois fagos diferentes de ϕ NA01 e ϕ NA03, apesar desses dois fagos serem capazes de infectar a cepa bacteriana utilizada na esporulação. Isso se deve ao fato das duas propostas

experimentais terem sido executadas concomitantemente e para que não houvesse conflito de informações nas publicações.

4.5 Isolamento e caracterização dos fagos utilizados

Utilizando-se a metodologia de isolamento sequencial por múltiplos hospedeiros, dois fagos polivalentes – PBSC1 e PBSC2 – foram isolados, ambos são capazes de infectar *B. subtilis* e *B. cereus* (Tabela 7). Para o isolamento, utilizou-se o mesmo estoque heterogêneo primário, feito a partir de amostras de solo, do qual isolou-se os fagos ϕ NA01 e ϕ NA03. As imagens de microscopia eletrônica da Figura 19 revelam a morfologia dos fagos. PBSC1 pertence à família *Myoviridea*, é não-envelopado, contém um capsídeo icosaédrico de 80 nm e uma cauda longa contrátil de 70 nm. PBSC2 pertence à família *Podoviridea* com um capsídeo icosaédrico de 70 nm e cauda pouco visível (n = 10).

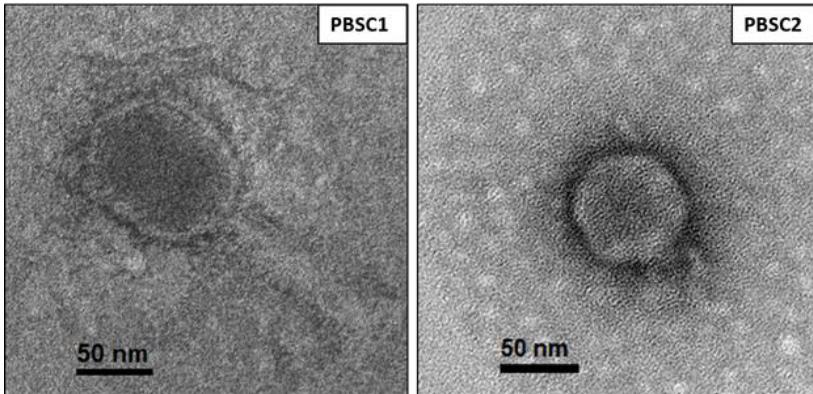
Tabela 7 EOP e parâmetros do ciclo de vida dos fagos PBSC1 e PBSC2 em relação aos hospedeiros *B. subtilis* e *B. cereus*.

Fago	Hospedeiro	EOP	Constante da taxa de adsorção (10^{-10} ml/min)	Tempo latente (min)	Burst size (PFU/cell)
PBSC1	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	1.00	17.2±0.7	35	132±15
	<i>B. cereus</i> NRS 248	0.74	6.59±0.8	35	101±14
PBSC2	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	1.00	5.35±0.4	40	99±12
	<i>B. cereus</i> NRS 248	0.76	4.32±0.5	40	86±12

O fago PBSC1 apresentou taxa de adsorção de $1,72 \times 10^{-9}$ mL/min para *B. subtilis* e $6,59 \times 10^{-10}$ mL/min para *B. cereus*. O fago PBSC2 apresentou valores mais baixos de 5,35 e $4,32 \times 10^{-10}$ mL/min para *B. subtilis* e *B. cereus*, respectivamente. Os períodos latentes de PBSC1 e PBSC2 foram, respectivamente, 35 min e 40 min em *B. subtilis*, com burst size de 132 e 101 UFP/célula.

Devido às características de interesse neste trabalho e pelo baixo grau de patogenicidade da espécie, *B. subtilis* foi também escolhido como hospedeiros de produção para ambos os fagos.

Figura 19 Imagem de microscopia eletrônica de transmissão dos fagos PBSC1 e PBSC2. Os fagos foram corados negativamente com acetato de uranila 2%. A escala é de 50 nm.



4.6 Definição e otimização da metodologia de incorporação de fagos aos esporos de *Bacillus subtilis*

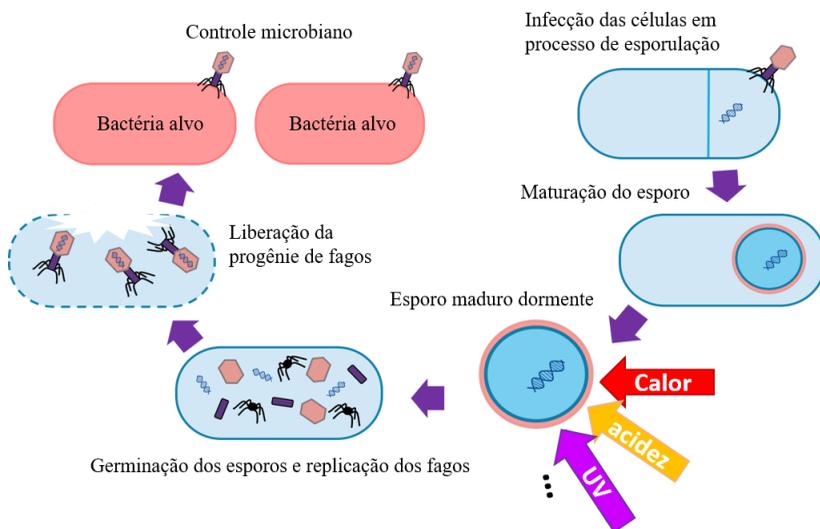
A efetividade do uso de fagos para o controle do crescimento microbiano nos mais diversos ambientes, depende não somente da capacidade do fago de destruir as bactérias problemáticas, mas também da possibilidade das partículas virais chegarem ao alvo com integridade. Considerando estas questões, preocupou-se em desenvolver uma técnica de *phage delivery* que fosse efetiva na proteção dos fagos contra efeitos adversos, promovendo-se sua captura em esporos bacterianos.

Com base em trabalhos realizados na década de 60 e 70 (TAKASHI, 1964; SONEINSHEN *et al.*, 1970) que demonstraram que um fago lítico poderia ser, deliberadamente, induzido a entrar num ciclo pseudolisogênico durante a esporulação de um hospedeiro do gênero

Bacillus, buscou-se desenvolver uma metodologia otimizada, cujo resultado final da técnica seja um grande número de esporos, contendo o DNA do fago em seu interior.

A Figura 20 representa a idéia geral envolvida no uso de esporos como carreadores e protetores de fagos durante sua aplicação em ambientes com condições adversas seguida da liberação da progênie, uma vez que seja induzida a germinação destes esporos.

Figura 20 Estratégia geral da incorporação de fagos em esporos, aproveitando o ciclo pseudolisogênico para usar os esporos como carreadores de fagos e garantindo sua proteção e posterior liberação da progênie.



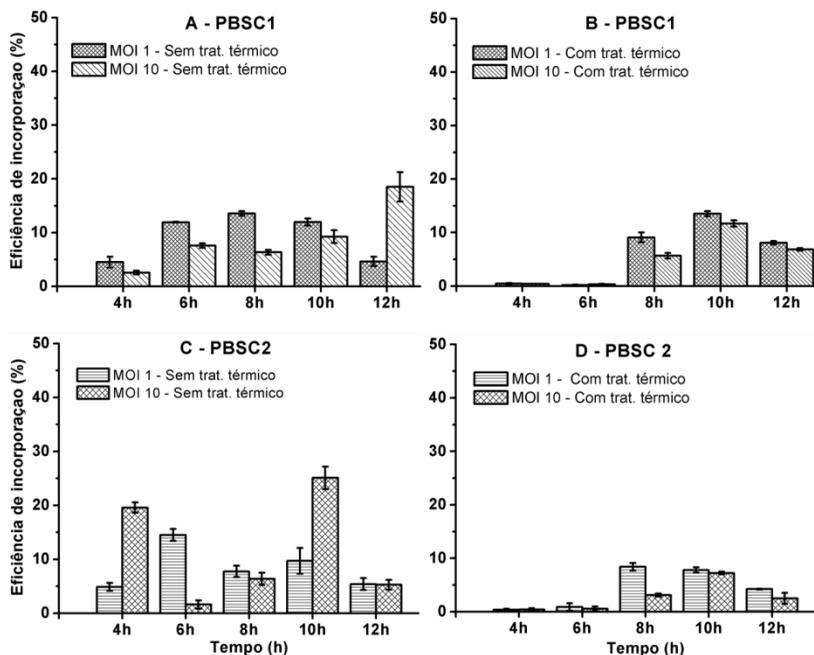
Este esquema gráfico serviu de base para o design experimental desta etapa do trabalho. Primeiro estabeleceu-se a metodologia que garantisse que o genoma dos fagos fosse retido pelos esporos de forma eficiente. Demonstrou-se que a estrutura resistente dos esporos protege os fagos contra condições ambientais desfavoráveis. A germinação dos esporos, de forma controlada, faz com que o fago retome o ciclo lítico, liberando a progênie que ainda é capaz de dar continuidade ao ciclo, infectando as bactérias alvo do biocontrole.

No processo de definição e otimização da metodologia, aplicou-se duas metodologias distintas com algumas variações nas condições aplicadas aos experimentos. Em todas as situações foi possível induzir a

transformação das células de *Bacillus subtilis* em esporos. No entanto, as proporções entre células vegetativas iniciais e aquelas capazes de concluir o processo de esporulação variaram bastante, assim como a proporção entre esporos totais formados e esporos contendo o genoma dos fagos em seu interior.

A Figura 21 mostra os resultados de ensaios realizados com base no Método 1, em que foram aplicados cinco diferentes tempos de incubação na etapa líquida (também considerada como etapa de indução da esporulação). A interação entre os fagos PBSC1 e PBSC2 com as células em estado de pré-esporo foi de 20 minutos. Diferentes proporções entre fagos e bactérias no momento da interação também foram aplicadas, para tanto, trabalhou-se com MOI 10 e MOI 1. O período de incubação das placas para maturação dos esporos foi de 24 horas. Além disso, comparou-se o efeito do tratamento térmico sobre os valores finais de eficiência de incorporação.

Figura 21 Ensaio de incorporação dos fagos PBSC1 e PBSC2 aos esporos de *Bacillus subtilis* utilizando o Método 1 e com dois MOIs diferentes. (A) Fago PBSC1 com amostras finais sem tratamento térmico. (B) Fago PBSC1 com amostras finais tratadas termicamente. (C) Fago PBSC2 com amostras finais sem tratamento térmico. (D) Fago PBSC2 com amostras finais tratadas termicamente.



Ao aplicar-se o Método 1 para incorporação de PBSC 1 a eficiência máxima foi 18% para as amostras não submetidas ao tratamento térmico, após 12 horas de incubação líquida e MOI 10. Com a aplicação do tratamento térmico, a condição com resultado final mais satisfatório (13%) muda para 10 horas de incubação líquida e MOI 1.

A queda na eficiência após o tratamento térmico revelou-se ainda mais acentuada para PBSC2, mas novamente não existiu um comportamento padronizado antes das amostras serem tratadas. Antes do tratamento térmico a maior eficiência, de 25%, foi obtida após 10 horas de incubação, com um MOI 10 na interação fago/ pré-esporo. Depois das amostras serem aquecidas, o melhor valor foi menor que 8%, alcançado com 8 horas e MOI 1.

Apesar de, em uma análise superficial inicial, os valores obtidos sem o tratamento térmico parecerem mais satisfatórios, os resultados referentes a esta condição não têm uma coerência que permita explicar seu comportamento, ou seja, sem o tratamento térmico, é difícil garantir a padronização e reprodutibilidade dos resultados.

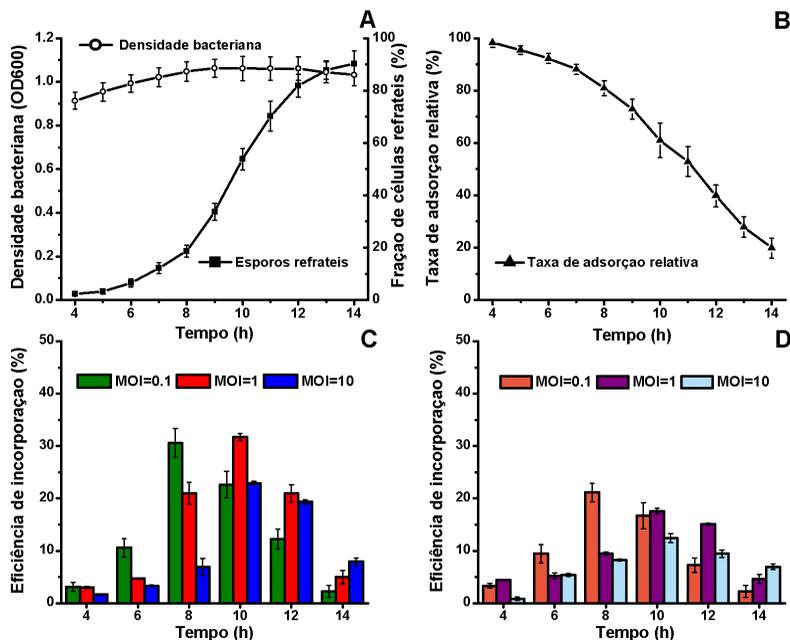
O melhor desempenho na eficiência das amostras não submetidas a tratamento térmico deve-se ao fato de que, sem a submissão a temperaturas mais elevadas, células vegetativas e vírus livres no meio, não são completamente eliminados pelo processo de purificação. Pôde-se verificar, por microscopia de contraste de fase (imagens não apresentadas), que a presença de células vegetativas era muito superior nas amostras que não haviam passado por tratamento térmico. Em função disso, buscando resultados mais padronizados e confiáveis, optou-se por adotar a etapa de tratamento térmico em todos os experimentos seguintes.

Os valores obtidos ao aplicar-se o Método 1 são compatíveis com os de Takahashi (1964), cujo trabalho serviu de base para estas condições experimentais. Este autor reportou que 11% do total dos esporos formados em seus ensaios possuíam o DNA do fago incorporado.

Verificou-se que outros autores obtiveram valores de eficiência de incorporação dos esporos drasticamente mais elevados (SONENSHEIN & ROSCOE, 1969). Além de trabalharem com fagos diferentes, estes estudos possuíam condições experimentais distintas, principalmente em relação ao meio utilizado e a procedimentos adotados antes da interação dos pré-esporos e fagos. O Método 2 deste trabalho foi adaptado a partir desta referência.

A Figura 22 apresenta os resultados dos ensaios realizados aplicando-se o Método 2. Além dos tempos de indução já testados nos experimentos anteriores, aplicou-se o tempo adicional de 14 horas. Em termos de MOI foram aplicadas três proporções diferentes: 0,1; 1,0 e 10,0. A interação entre fagos e pré-esporos também foi de 20 min e o tempo de maturação foi mantido em 24 horas. Os resultados são apresentados em termos de produção de esporos, de queda na adsorção dos fagos livres ao longo do processo de esporulação e de eficiência de incorporação dos fagos PBSC1 e PBSC2.

Figura 22 Tempo de esporulação de *B. subtilis* e eficiência da incorporação de fagos nos esporos. (A) Densidade bacteriana (absorbância) e fração de *B. subtilis* em termos de formas refrateis (esporos) ao longo do tempo. (B) Taxa de adsorção relativa de PBSC1 durante o processo de esporulação de *B. subtilis*. Eficiência de incorporação dos fagos PBSC1 (C) e PBSC2 (D) em diferentes MOIs e tempos de incubação líquida (indução de esporulação).



Em comparação ao Método 1, o Método 2 resultou em valores de eficiência mais elevados tanto na incorporação do fago PBSC1, chegando a 32% (10 h de indução, MOI 1), quanto do fago PBSC2, cujo valor máximo alcançado foi de 23% (8 h indução, MOI 0,1).

O melhor desempenho do Método 2 pode estar ligado à etapa de sincronização das células bacterianas ao processo de esporulação. Sendo assim, no momento da interação entre os fagos e esporos, uma maior proporção de células presentes naquele meio estará na fase ideal do processo, permitindo que o fago injete seu DNA no interior da célula, e bloqueando a continuidade do ciclo lítico que causaria a lise celular.

A fração de formas refrateis de *B. subtilis* (neste caso, interpretadas como células se transformando em esporos) aumentou

continuamente no meio durante a esporulação enquanto as taxas de adsorção de fagos diminuam (Figura 22A e 22B), indicando a transformação de *B. subtilis* de células vegetativas em esporos. O fato da taxa de adsorção de esporos se reduzir gradativamente com o tempo de esporulação deve-se às mudanças na superfície celular, inerentes ao processo de esporulação (RIESENMAN *et al.*, 2000). Qualquer transformação que interfira nas moléculas da superfície bacteriana que atuam como receptores dos fagos, acaba por interferir, direta ou indiretamente, na adsorção da partícula viral a ela.

É possível verificar também que os valores de eficiência são diferentes para os dois fagos, mesmo em condições experimentais idênticas e, principalmente após tratamento térmico, PBSC1 tem resultados superiores em relação a PBSC2. Yehle e Roy (1967) também verificaram diferença acentuada na entre dois fagos diferentes ($\beta 3$ e $\beta 22$) na porcentagem de partículas virais que ficavam retidas dentro de esporos maduros após interação com células em processo de esporulação. Estes mesmos autores utilizaram um tratamento térmico de 80°C por 10min e reportaram 20% de queda no total de esporos contendo fagos em seu interior após este procedimento.

Entre os fagos mais estudados no fenômeno de pseudolisogenia associado a esporos de *B. subtilis*, inclusive em termos de mecanismos moleculares, estão o fago $\phi\epsilon$ e o fago $\phi 29$. Moreno (1979) encontrou não apenas valores finais distintos em eficiência de incorporação, mas também diferenças no momento ideal (em relação ao tempo transcorrido de indução da esporulação) para interação fago/pré-esporo. Enquanto o fago $\phi 29$ parece ter mais sucesso sendo incorporado nos tempos iniciais de esporulação, resultados melhores são obtidos quando $\phi\epsilon$ é adicionado junto ao pré-esporo em estágios mais adiantados. Sonenshein (2005) sugere que esta diferença nas condições ideais e resultados finais para cada fago pode estar ligada a mecanismos moleculares distintos envolvidos na segregação do material genético do fago para o interior do esporo em formação, dependendo da presença, ou não, de algumas proteínas no genoma viral.

Embora o fago PBSC1 continue mantendo no Método 2 uma eficácia de incorporação mais alta do que o PBSC2 sob as condições testadas, ambos os fagos mostraram padrões de incorporação semelhantes em relação ao estágio de esporulação. Para os MOIs de 1 e 10, o tempo ideal para a incorporação do fago foi de 10 h após a inoculação, quando cerca de 44% das células estavam na forma refrátil e

a esporulação estava ocorrendo em maior velocidade (Figura 21A). No entanto, aplicando-se um MOI inferior (0,1) o tempo ideal foi de 8 h pós-inoculação, quando apenas cerca de 10% das células estavam na forma refrátil.

Tanto para PBSC1 quanto para PBSC2, os tempos iniciais de incubação líquida (4h e 6h) apresentam resultados inferiores aos demais tempos nas duas metodologias testadas, sendo, portanto, descartados dos próximos ensaios.

O momento da introdução do fago no meio contendo as bactérias em processo de esporulação é importante para uma incorporação eficiente, conforme já demonstrado por outros autores (SONENSHEIN & ROSCOE, 1969; KAWAMURA & ITO, 1974). A adição de fagos, seja de forma precoce (4 ou 6 h) ou tardia (14 h) no processo de esporulação, resultou em baixas eficiências de retenção (<12%), independentemente dos MOIs aplicados. Bactérias no estágio inicial da esporulação ainda são vulneráveis à continuação do ciclo lítico do fago, enquanto as bactérias no estágio tardio da esporulação podem interromper o reconhecimento do fago e a infecção por causa de alterações na morfologia celular e nos receptores de superfície (RIESENMAN *et al.*, 2000).

Estágios de esporulação mais avançados requerem maiores concentrações de fagos para infectar com sucesso os pré-esporos devido à menor taxa de adsorção que se estabelece. Assumindo uma distribuição de Poisson de adsorção de fagos (ABEDON & CAMERON, 2010), cerca de 100% das bactérias teriam adsorvido pelo menos um fago em um MOI de 10, comparado a 63,2% em MOI = 1 e 9,5% em MOI = 0,1. No entanto, maiores taxas de adsorção dos fagos não, necessariamente, resultaram em maior eficiência de incorporação. Uma hipótese é de que, para altos MOIs, a replicação de fagos pode interferir e interromper o processo de esporulação, principalmente devido à liberação de nutrientes causadas por uma possível lise da célula mãe. Somente no final do processo de esporulação, com o tempo mais elevado de indução (14 h), observou-se uma correlação positiva entre MOI e eficiências de incorporação. No entanto, se a esporulação está em estágio avançado, nem mesmo os altos MOIs podem facilitar a infecção após as mudanças nos receptores de fago, resultando em baixa eficiência de incorporação.

Meijer *et al.* (2005) postulam que a execução adequada dessa estratégia que permite que o fago aproveite as propriedades notáveis de resistência e dormência do esporo, presumivelmente requer (a) a supressão do ciclo de desenvolvimento do fago e (b) a segregação do genoma do fago no compartimento polar que dá origem ao pré-esporo.

Portanto, o momento ótimo para a interação entre o pré-esporo e o fago deve coincidir com uma das etapas de formação dos esporos, em que as mudanças bioquímicas que estão ocorrendo na célula não estejam tão avançadas ao ponto de não permitir que o fago permeie a membrana celular e, ao mesmo tempo, já existam genes se expressando de modo que o fago não consiga dominar os mecanismos de replicação da célula.

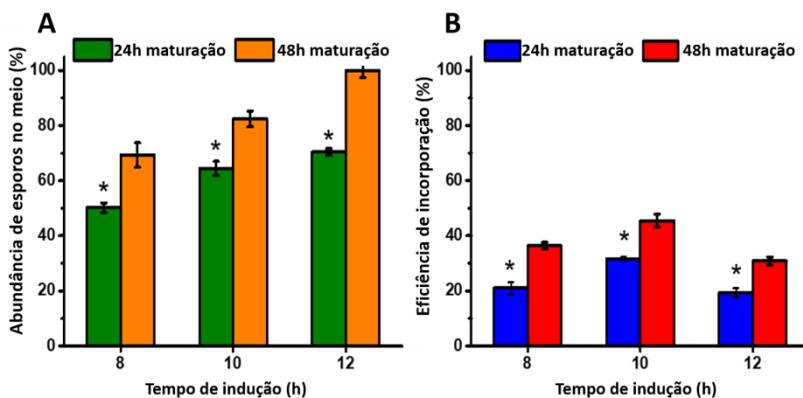
Dois mecanismos diferentes são atribuídos à interrupção do ciclo lítico do fago. Um deles está relacionado à expressão diferenciada do fator σ em células durante a esporulação (SONENSHEIN, 2005). Descobertos por Burgess *et al.* (1969), os fatores σ são as subunidades de reconhecimento das regiões promotoras da RNA polimerase bacteriana que direcionam a RNA polimerase para promotores específicos com base nas suas sequências específicas. A RNA polimerase de *B. subtilis* possui um fator σ específico para o crescimento vegetativo e outro fator σ específico para a esporulação (FIMLAID *et al.*, 2015). No entanto, as regiões promotoras dos fagos são, supostamente, reconhecidas apenas pelo fator σ expresso durante o crescimento vegetativo tendo a continuidade do seu ciclo virulento bloqueado em esporos. Outro estudo, focado na compreensão dos mecanismos moleculares responsáveis pela incorporação do fago $\phi 29$ em *B. subtilis*, atribuiu à proteína Spo0A, que é ativada, na bactéria, por sinais que indicam limitação de nutrientes (STRAUCH, *et al.*, 1993) a inibição da transcrição dos promotores mais precoces de $\phi 29$, necessários ao ciclo lítico do fago (MEIJER *et al.*, 2005). Este mesmo estudo atribuiu a segregação do genoma do fago no compartimento do pré-esporo à proteína Spo0J, responsável pela segregação cromossômica (LEE *et al.*, 2003). Esta proteína, expressa na célula em esporulação, se liga especificamente às regiões parS do fago $\phi 29$, direcionando o fago adequadamente ao compartimento de pré-esporo durante a diferenciação.

Apesar das evidências apresentadas em ambos os estudos, os mecanismos moleculares responsáveis por essa poderosa estratégia de sobrevivência ainda necessitam ser amplamente explorados.

Considerando os dados da presente pesquisa, não se pode atribuir o caso dos fagos PBSC1 e PBSC2 a um nem ao outro.

Ainda em busca de condições experimentais que garantissem maior eficiência na obtenção de fagos incorporados aos esporos, explorou-se a influência do aumento no tempo de maturação dos esporos nos resultados finais. Nestes experimentos apenas as condições anteriores que haviam apresentado resultados mais satisfatórios foram aplicadas. A Figura 23 mostra os resultados comparando-se 24 h (utilizado nos experimentos anteriores) e 48 h de maturação. Aplicou-se 8 h e 10 h nos tempos de indução da esporulação. Apenas o fago PBSC1 foi utilizado e o MOI aplicado foi 1,0.

Figura 23 Efeito do tempo de maturação (24h ou 48h) sobre as suspensões finais de esporos em termos de (A) abundância e (B) eficiência de incorporação do fago PBSC1. Os asteriscos (*) representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre 24 h de maturação e 48 h de maturação.



O aumento do tempo de maturação dos esporos de 24 h para 48 h resultou em um aumento significativo na abundância de esporos totais, chegando próximo a 100% quando submetido a 12 h de incubação líquida prévia. Da mesma forma, quando os esporos foram submetidos a tratamento térmico, os fagos foram mais resistentes quando encapsulados por esporos maduros (48 h) do que em menos maduros (24 h), e exibiram maior eficiência de incorporação de esporos. Maiores eficiências de incorporação de fagos aos esporos foram obtidas em todas as condições aplicadas, gerando até 45% de eficiência com 10 h de

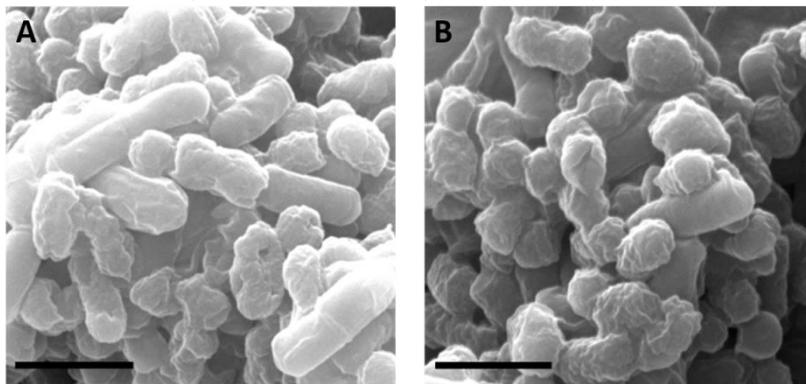
incubação líquida, para 8 h de incubação líquida, o resultado final aumentou de 21% para 38% de eficiência e nas 12 h o aumento foi ainda mais significativo, de 19% para 39%.

A maturação do esporo é o estágio VI da esporulação, onde os esporos desenvolvem resistência total ao calor e resistência à lisozima, somente depois que, no estágio VII, a célula-mãe se lisa e o esporo maduro se torna metabolicamente inativo (NICHOLSON & SETLOW, 1990). Esporos submetidos ao tratamento térmico, antes de estarem completamente maduros, apresentam menor resistência e são, portanto, mais vulneráveis. Os mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos na pseudolisogenia ainda são incertos. É possível que esporos contendo um DNA exótico sejam ainda mais vulneráveis a algumas condições extremas, ainda não se sabe como a incorporação de fagos afeta o curso e os mecanismos da esporulação. Outro aspecto a ser mencionado é que esporos contendo fago, após 24h de maturação, provavelmente não são mortos porque o ciclo lítico do fago é ativado (uma vez que a virulência do fago parece ser perdida logo após o aprisionamento), mas sim pela sua vulnerabilidade ao calor.

O tempo de maturação dos esporos está relacionado à aquisição de resistência ao calor úmido (SANCHEZ-SALAS *et al.*, 2011), e como a purificação incluiu tratamento térmico (70°C por 30 min), maturações mais longas resultaram em maior rendimento de esporos viáveis. Concentrações de esporos satisfatórias foram obtidas em 24 horas de maturação, mas a duplicação desse tempo resultou em suspensões finais de esporos mais puras, já que mesmo após a fase de maturação ser concluída as células vegetativas remanescentes são gradativa e naturalmente eliminadas (NICHOLSON & SETLOW, 1990).

A Figura 24 apresenta imagens de microscopia eletrônica de varredura de amostras dos esporos produzidos com tempo de maturação de 24 h e 48 h.

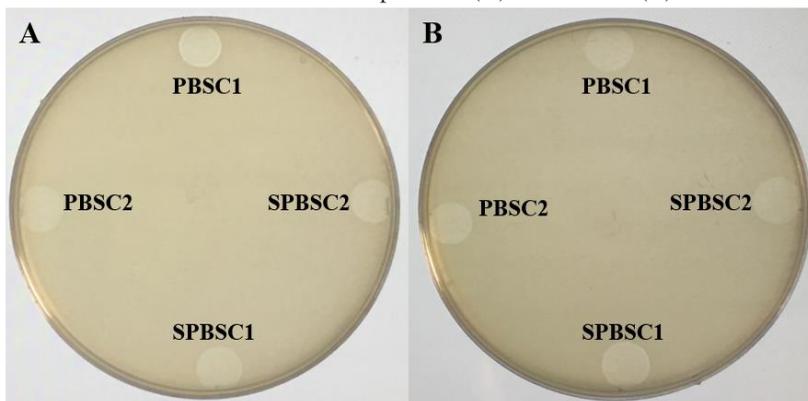
Figura 24 Imagem de microscopia eletrônica de varredura para demonstrar o efeito do tempo de maturação sobre a pureza das suspensões finais de esporos. (A) 24 h de maturação (B) 48 h de maturação. Escala de 1 μm .



Mesmo com a otimização da metodologia, os valores de eficiência atingidos neste experimento são menores do que aqueles reportados nos trabalhos cuja metodologia serviu de base, os quais atingiram 71% de eficiência de incorporação de fagos aos esporos (SONHENSEIN e ROSCOE, 1969). Esses autores conduziram os experimentos do início ao fim em cultura líquida (indução da esporulação e maturação) e usaram um sêrum específico anti-fago para acabar com os fagos livres no meio logo após o tempo determinado para infecção. Estas medidas levam a um maior controle do processo, que juntamente com a característica particular de cada fago utilizado, pode resultar em maior eficiência final.

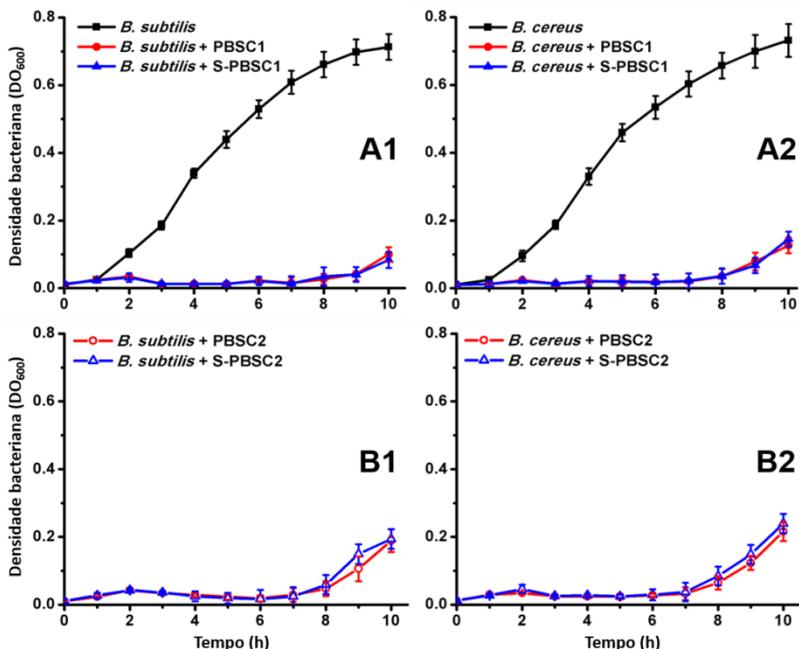
Como o tratamento térmico (70°C por 30 min) assegurou a inativação de fagos livres (aqueles que não foram incorporados aos esporos mas permanecem no meio), a presença de placas de lise quando as suspensões de endósporos foram submetidas a ensaios de dupla camada de ágar indica que estas são resultantes de fagos que se encontravam encapsulados pelos esporos. O ensaio de *drop spot test*, apresentado na Figura 25, confirma que os fagos liberados pelos esporos mantiveram o mesmo espectro de hospedeiros que os fagos originais.

Figura 25 Drop spot test dos fagos PBSC1 e PBSC2. Os fagos originais (PBSC1 e PBSC2) e os fagos encapsulados em esporos (SPBSC1 e SPBSC2) formaram zonas líticas claras nos hospedeiros (A) *B. subtilis* e (B) *B. cereus*.



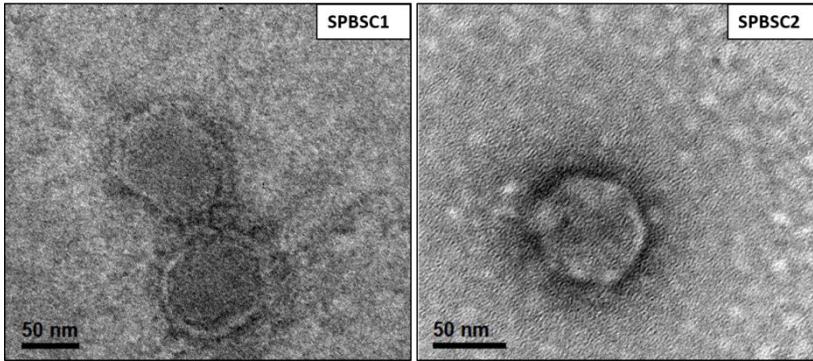
Além disso experimentos de crescimento bacteriano em batelada mostraram que os fagos liberados dos esporos exibiram atividade antimicrobiana semelhante aos seus ancestrais (Figura 26).

Figura 26 Experimentos de crescimento em batelada mostrando os efeitos inibitórios PBSC1 e PBSC2 nos hospedeiros. (A1) Efeito inibitório de PBSC1 livre e PBSC1 liberado por esporos (S-PBSC1) em *B. subtilis* e (A2) *B. cereus*. (B1) Efeito inibitórios de PBSC2 livre e PBSC2 (S-PBSC2) liberado por esporos em *B. subtilis* e (B2) *B. cereus*. O MOI inicial era 10.



Imagens de microscopia eletrônica de transmissão mostraram que, após passarem por todas as etapas do processo de incorporação aos esporos e seu genoma ficar retido no interior desta estrutura por cerca de 3 semanas, a progênie liberada com a germinação dos esporos não apresenta alterações morfológicas em PBSC1 e PBSC2 (Figura 27). As partículas virais também mantiveram as mesmas dimensões que as originais.

Figura 27 Imagens de microscopia eletrônica de transmissão dos fagos PBSC1 e PBSC2 após a germinação e esporos. Os fagos foram corados negativamente com acetato de uranila a 2%. A escala é de 50 nm.

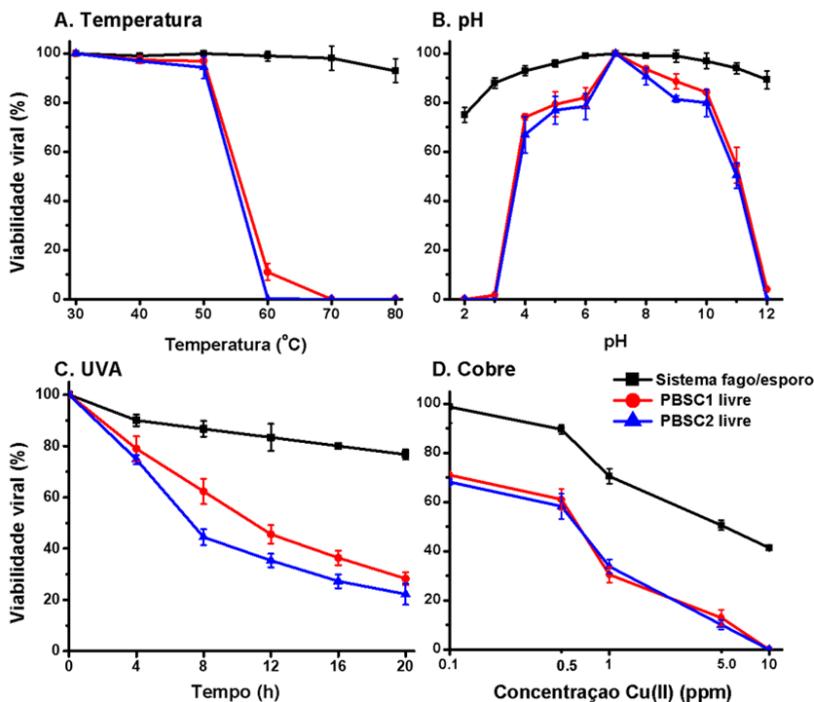


4.7 Ensaio de resistências – fagos livres comparados aos fagos incorporados a esporos.

Diversos autores já reportaram a perda de viabilidade de fagos por influência de fatores ambientais, seja em ambientes naturais (SUTTLE & CHEN, 1992), durante sua aplicação como ferramentas de biocontrole (IRIARTE *et al.*, 2007) ou em testes de resistência específicos (SCHAPER *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2013).

No intuito de demonstrar que o sistema fago/esporo é efetivo como forma de proteção aos fagos contra condições físico-químicas adversas, expôs-se fagos livres e fagos incorporados a esporos a diferentes condições de temperatura, pH, radiação UVA e concentrações de cobre (Figura 28).

Figura 28 Ensaio de resistência com fagos PBSC1 e PBSC2 livres e na forma encapsulada em esporos. (A) Tratamento térmico por 15 min nas temperaturas estipuladas no eixo horizontal do gráfico. (B) Exposição a diferentes pHs conforme indicado no eixo horizontal, durante 60 min. (C) Exposição à radiação UVA ao longo de 20 horas. (D) Exposição a diferentes concentrações de cobre conforme indicado no eixo horizontal.



Ambos os fagos demonstraram ser capazes de manter sua viabilidade próxima a 100% quando expostos durante 15 min a 40 °C e 50 °C passando a ter uma queda drástica nas contagens, quando a temperatura é igual ou maior a 60 °C. O fago PBSC2 demonstrou ser ligeiramente mais sensível ao calor.

É bem conhecido que os fagos expostos a altas temperaturas são rapidamente inativados (ROSSI *et al.*, 1999). O PBSC1 e o PBSC2 tiveram o mesmo comportamento que a maioria dos fagos relatados (GARCIA *et al.*, 2009; MA *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2016) apresentando

altas taxas de inativação acima de 50 °C (Figura 28A). Por outro lado, quando incorporados aos esporos, os fagos mantêm sua viabilidade próxima a 100% mesmo após serem submetidos ao tratamento térmico até 70 °C, apresentando uma queda de apenas 4% nas partículas virais viáveis em 15 min de exposição a 80 °C.

Muitos estudos já investigaram a resistência dos esporos bacterianos a múltiplas condições ambientais (SETLOW, 2006), mostrando que eles podem resistir a temperaturas superiores a 100°C (KORT *et al.*, 2005). Um grande número de fatores está envolvido na resistência ao calor úmido de esporos (SETLOW, 2014) e as condições experimentais em que os esporos são formados podem ser determinantes na formação das estruturas e compostos envolvidos (CONDON *et al.*, 1992). O núcleo central, que é a camada mais interna dos esporos, é o principal responsável pela resistência ao calor úmido. Um teor mais baixo de água no núcleo tem um papel fundamental na resistência ao calor úmido e pode estar diretamente relacionado à temperatura de formação de esporos (NGUYEN *et al.*, 2011). O ácido dipicolínico (DPA) também tem um papel indireto, mas não menos importante, uma vez que o conteúdo de água do núcleo diminui de acordo com o acúmulo de DPA durante a formação de esporos (MAGGE *et al.*, 2008). A saturação do DNA com proteínas de esporos tipo α / β solúveis em ácido (SASP), bem como a proporção e os tipos de íons metálicos bivalentes são outros dois fatores com influência na resistência ao calor úmido de esporos (BRUL *et al.*, 2011)

Fagos comumente têm ótima estabilidade e infectividade em pH próximo do neutro (JONKZYC *et al.*, 2011). Em valores extremos de pH, a presença de radicais reativos livres aumenta drasticamente devido às altas concentrações de íon hidrogênio e íon hidroxila presentes no meio, dominando os mecanismos de inativação viral (FENG *et al.*, 2003). Este é o caso de fagos aplicados como agentes de biocontrole no intestino humano, cujo efeito limitado contra bactérias não foi apenas devido aos baixos valores de pH, mas sua difusão em meios viscosos foi afetada negativamente (MÜLLER-MERBACH *et al.*, 2005). Esta condição de dificuldades na difusão (devido a presença de sólidos em suspensão, neste caso) e acidez também é facilmente encontrada em sistemas de tratamento de efluentes. Os componentes estruturais do vírus (capsídeo, fibras da cauda, etc.) podem sofrer oxidação direta quando expostos a esses ambientes, e a dissociação do capsídeo traz

como consequência a degradação do ácido nucléico do vírus (SCHIJVEN *et al.*, 2016).

Nos experimentos com pH mostrados na Figura 25B, fagos incorporados em esporos tiveram uma redução de viabilidade máxima de 25% para pH extremamente baixos. Enquanto os fagos livres foram totalmente inativados em pH = 4,0 ou acima do pH = 11,0. A membrana interna do esporo, que envolve o núcleo, é composta por lipídios imobilizados, resultando em baixa permeabilidade (mesmo para a água) protegendo, conseqüentemente, o núcleo do esporo de produtos químicos que danificam o DNA (SELLA *et al.*, 2014). Alguns ácidos fortes são capazes de causar danos internos à membrana, mas mesmo os álcalis mais fortes dificilmente matam os esporos. Em geral, substâncias básicas apenas inativam as enzimas líticas necessárias para a hidrólise do córtex do esporo no processo de germinação, o que pode ser recuperado com o tratamento com lisozima (SETLOW *et al.*, 2002).

A maioria das cinéticas de inativação dos fagos por UV têm demonstrado seguir uma reação de primeira ordem, sendo um processo de uma única etapa, embora diferentes fagos tenham suscetibilidade variável a esta radiação (MISSTEAR *et al.*, 2012). Enquanto algumas partículas virais são eficientemente inativadas pela luz solar natural, existem estudos mostrando que alguns fagos podem resistir a radiações artificiais dentro do espectro de comprimentos de onda UV. Mamane *et al.* (2007) testaram a inativação dos fagos MS2, T4, T7 e esporos de *B. subtilis*, de forma independente, quando submetidos a radiação UV e a Processo de Oxidação Avançada (POA), utilizando sistema UV/H₂O₂. Entre os fagos, apenas MS2 demonstrou resistência quando expostos a UV por apenas 15min, no entanto, quando H₂O₂ é adicionado ao sistema, mesmo este fago sofre decaimento. Nenhuma das condições testadas foi capaz de causar perda da viabilidade dos esporos.

Dentro de 20 horas do ensaio de irradiação UV, pode-se observar uma diferença de viabilidade superior a 40% entre os fagos livres e os fagos protegidos por esporos. O fago PBSC2 se mostrou o mais sensível à exposição, mantendo a viabilidade de infecção, ao final de 20 horas de exposição, de apenas 25% do total das partículas virais. O sistema fago/esporo teve um decaimento de apenas 20% das partículas virais viáveis.

De acordo com Nicholson *et al.* (2005), um fator que pode estar envolvido na resistência dos esporos à UV é a presença de pigmentos

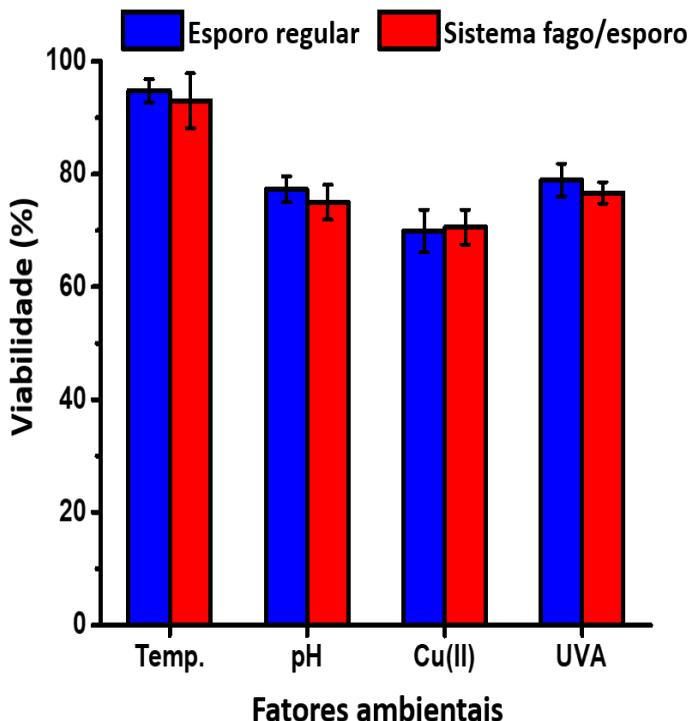
capazes de absorver a radiação na camada mais exterior do esporo, fazendo com que componentes internos como o DNA, sensíveis ao UV, sejam protegidos.

O alto grau de proteção do DNA é um fator importante na sobrevivência dos esporos quando expostos a radiação UVA ou qualquer outra, uma vez que os mecanismos de reparo do DNA durante a dormência dos esporos não funcionam, devido a inatividade das enzimas do núcleo (SETLOW, 1995). A proteção do DNA do esporo está também associada à ligação das proteínas SASP ao seu DNA (POPHAM *et al.*, 1995) e a presença de pigmentos escuros nas camadas externas do esporo que são estruturalmente semelhantes à melanina e podem absorver a radiação UV (SETLOW, 2006; NICHOLSON *et al.*, 2005; MC KENNEY *et al.*, 2012). Além disso, há um mecanismo de reparo rápido do DNA durante a germinação do *B. subtilis* que pode corrigir pequenos danos, desde que vez que eles não tenham sido acumulados ao longo de anos de dormência (SETLOW, 2006).

Embora seja essencial em muitos processos biológicos, o cobre é conhecido há muito pela sua toxicidade em altas concentrações, inclusive em vírus, que são inativados por danos a moléculas biologicamente críticas (LI *et al.*, 2011). A Figura 28D mostra como o PBSC1 e o PBSC2 são diretamente afetados pelo aumento da concentração de cobre, enquanto os fagos protegidos no esporo tiveram uma perda de viabilidade menos dramática.

Com intuito de verificar se os esporos que carregam o genoma do fago PBSC1 em seu interior têm maior ou menor capacidade de resistir aos fatores ambientais já aplicados aos fagos, alguns testes de resistência com condições mais extremas foram aplicados igualmente a esporos normais e esporos contendo fagos (Figura 29), ambos produzidos com as mesmas experimentais.

Figura 29 Resistência de esporos normais e esporos infectados por fagos. O tempo de maturação do esporo foi de 48 h. A viabilidade de esporos normais e esporos infectados por fagos foi calculada com base nas UFC e COI relativas, antes e depois do tratamento, respectivamente. Esporos normais e esporos infectados por fagos apresentaram resistência ambiental similar à temperatura alta (80 °C), pH 2, Cu^{+2} (1ppm) e UVA.

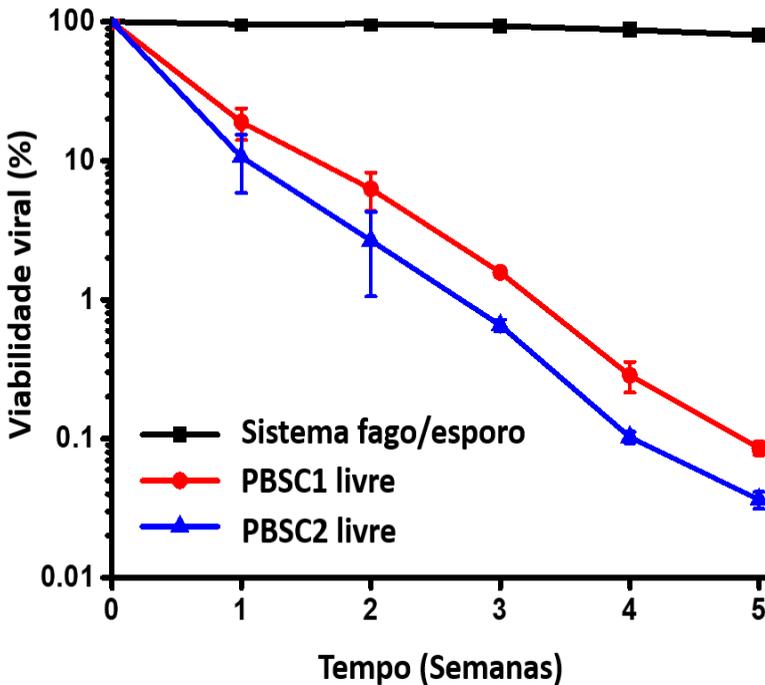


O efeito dos fagos na viabilidade dos esporos regulares e esporos portadores do genoma dos fagos foi estatisticamente indistinguível, demonstrando que a presença do genoma do fago no interior do esporo não interfere na capacidade de resistência desta estrutura aos diferentes fatores ambientais.

Outro aspecto importante para o aproveitamento de fagos como ferramentas no controle de crescimento microbiano, é sua estocagem. Fagos são conhecidos por facilmente perderem sua viabilidade ao serem mantidos em temperatura ambiente ou outros locais menos apropriados.

No entanto, a manutenção de grandes volumes de suspensão sob temperaturas baixas, pode implicar em custos elevados de tratamento, tornando-se outro fator de inviabilidade. Por isso, acessou-se a capacidade dos esporos em manter a viabilidade de fagos por períodos mais longos, quando manidos em temperatura ambiente. A Figura 30 apresenta os resultados referentes a estes experimentos.

Figura 30 Viabilidade viral dos fagos PBSC1 e PBSC2 livres e do sistema fago/esporo após estoque em temperatura ambiente, protegidos da luz, durante o tempo indicado no gráfico.



Observou-se que, ao permanecerem em temperatura ambiente o decaimento da viabilidade dos fagos assumiu uma cinética de primeira ordem com coeficientes de 0,2 e 0,22 d^{-1} para os fagos livres PBSC1 e PBSC2 em suspensão, respectivamente. Enquanto isso, o sistema fago/esporo, composto por esporos contendo fagos, secos a temperatura ambiente, não apresentou queda significativa na viabilidade dos fagos ao longo das 5 semanas de teste.

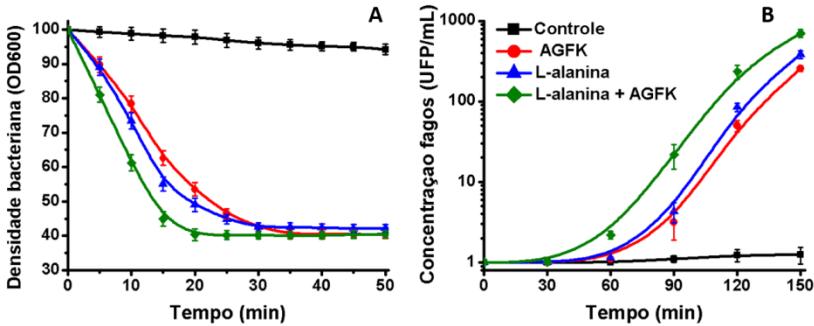
Todas as condições testadas nos experimentos de resistência comprovaram a capacidade dos esporos em atuar como sistemas de carreamento e proteção dos fagos. De fato, o estado pseudolisogênico pode explicar a sobrevivência a longo prazo dos vírus em ambientes desfavoráveis, revelando-se para uma estratégia evolutiva natural que permite aos fagos adaptar seu ciclo de vida às condições fisiológicas do hospedeiro e, conseqüentemente, garantir e otimizar sua proliferação (MEIJER et al, 2005; RIPP et al., 1997).

4.8 Liberação controlada da progênie de fagos por meio de estimulação da germinação dos esporos.

A germinação e o crescimento de esporos são caracterizados pela alta variabilidade no comportamento de células individuais. Este processo geralmente é iniciado quando um ou mais receptores de germinação (RGs), localizados na membrana interna dos esporos, detectam seu germinante correspondente e iniciam uma série de eventos bioquímicos (PAREDES-SABJA *et al.*, 2011). Para controlar a germinação de esporos e, conseqüentemente, promover a liberação de fagos, é possível induzir o processo através da incubação dos esporos com substâncias que atuam como germinantes, tais como L-valina, L-alanina e uma mistura de AGFK (LUU *et al.*, 2015). Uma vez que os RGs reconhecem os nutrientes apropriados, o esporo se compromete com a germinação de forma irreversível e o processo segue mesmo se o germinante for removido ou a ligação for revertida e inibida (NAGLER *et al.*, 2014).

Para estimular a germinação dos esporos em tempos menores do que os obtidos sem estímulos, comparou-se os efeitos de dois germinantes (L-alanina e a mistura AGFK) isoladamente e em combinação, observando o comportamento das células (Figura 31A) e a abundância de fagos no meio (Figura 31B).

Figura 31 Indução da germinação dos esporos e liberação da progênie do fago retido PBSC1. (A) A germinação de *B. subtilis* desencadeada por diferentes germinantes foi monitorada por mudanças na densidade óptica (DO_{600} inicial = 0,8). (B) Liberação de PBSC1 retido sob diferentes condições de indução. As concentrações dos germinantes foram 20 mM para L-alanina, 20 mM para cada um dos componentes de AGFK ou 10 mM L-alanina + 10 mM cada componente de AGFK para o tratamento combinado.



Com base na queda observada na densidade ótica durante a germinação de esporos, o tempo de germinação foi estimado em 30 a 35 minutos quando induzido com 20 mM de L-alanina ou 20 mM de mistura de AGFK. A germinação mais rápida foi induzida pela combinação de 10 mM de L-alanina e 10 mM de mistura de AGFK. Uma vez que os fagos são incorporados aos esporos, seu período latente inicial deve considerar, além do tempo regular, o tempo de germinação do esporo e desenvolvimento celular, o que aumenta o tempo necessário para a replicação do fago. O fago PBSC1 normalmente tem um tempo latente de 35 min mas, quando encapsulado em esporos, produz apenas contagens virais baixas durante os primeiros 150 min de germinação. No entanto, quando a mistura de L-alanina ou AGFK é adicionada, a replicação do fago é observada mais cedo, em cerca de 90 a 120 min a progênie já é liberada. Observou-se também que os períodos latentes foram reduzidos para cerca de 60 min quando as culturas foram estimuladas com L-alanina e AGFK simultaneamente.

Nos esporos de *B. subtilis*, o receptor GerA responde à L-alanina, enquanto a mistura AGFK atua nos receptores GerB e GerK para desencadear a germinação (SETLOW, 2014). Em concordância com os nossos resultados, trabalhos anteriores também mostraram que as combinações de germinantes podem ser mais eficazes do que quando

aplicadas individualmente (BARLASS *et al.*, 2008; ALTURI *et al.*, 2006). Isso pode acontecer porque a germinação com L-alanina via GerA pode ser estimulada por glicose e K^+ – ambos componentes da mistura AGFK, considerados cogermínantes – e esta simulação requer cooperação do receptor GerK (YASUDA & TOSHIKUBO, 1984; MONGKOLTHANARUK *et al.*, 2011). Assim, os esporos não apenas integram, mas também podem amplificar sinais de múltiplos germínantes e múltiplos RGs e acelerar, desta forma, a germinação total de esporos.

4.9 Proposição de metodologia modificada no biocontrole com uso de bacteriófagos

Os fagos têm demonstrado forte potencial para combater bactérias resistentes a antibióticos através de múltiplos modos de ação (por exemplo, controle microbiano seletivo (VIERTEL *et al.*, 2014) dispersão de biofilme (BHATTACHARJEE *et al.*, 2015) e re-sensibilização por resistência a antibióticos (YOSEF *et al.*, 2015). A eficácia do tratamento de fagos depende não apenas de interações específicas fago-hospedeiro, mas também da conservação da viabilidade do fago durante o tratamento.

Os resultados obtidos até aqui demonstram que a criação de um sistema fago/esporo como estratégia para transporte e proteção de fagos é tecnicamente viável e vantajosa, já que aumenta em muitas vezes a viabilidade dos vírus expostos a diferentes condições ambientais, quando comparado ao fago livre.

As vantagens do uso de fagos com amplo espectro de hospedeiros para o controle de crescimento microbiano também já são bem estabelecidas e incentivadas por pesquisadores da área (LY-CHATAIN, 2014; LU & KOERIS, 2011).

O biocontrole convencional de fagos baseia-se no uso de fagos com espectro de hospedeiros limitado, que precisam ser produzidos utilizando a mesma bactéria alvo de controle, o que pode criar preocupações referentes a segurança, logística de produção e surgimento de resistência.

Um aspecto importante dos fagos polivalentes é que eles podem ser produzidos usando múltiplos hospedeiros, contornando-se a necessidade de utilizar hospedeiros patogênicos ou difíceis de cultivar

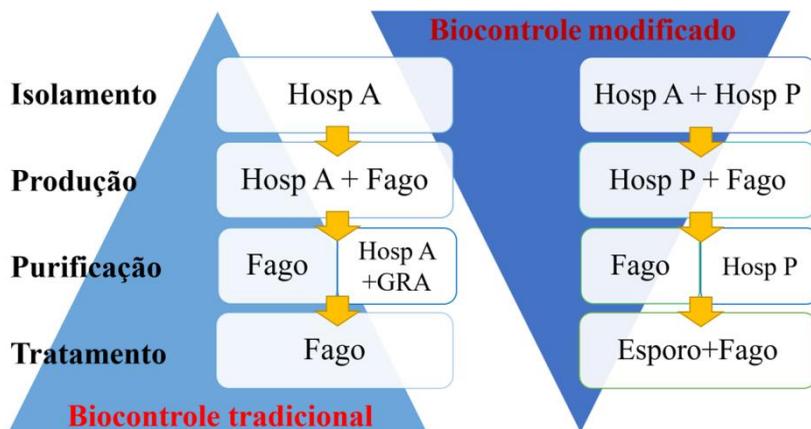
durante a produção. Evitar a exposição mais frequente do fago com o hospedeiro alvo também ajuda a reduzir o desenvolvimento e proliferação de mutantes bacterianos insensíveis a ele.

Em relação a aspectos econômicos, a possibilidade de produção do fago com hospedeiros seguros, pode significar a extinção da etapa de purificação (separação do hospedeiro), levando a economias significativas em capital e custos operacionais. Além disso, a manutenção da viabilidade das partículas virais proporcionada pelo sistema fago/esporo implica em menor necessidade de dosagens repositórias, além de, conforme demonstrado, garantir estoques por prazos maiores sem necessidade de refrigeração.

Em resumo, os fagos polivalentes podem ser cultivados com segurança e introduzidos nos locais de aplicação incorporados a esporos, aumentando as chances de um número maior de partículas virais chegarem até o alvo, mantendo a capacidade de infecção e aumentando assim a supressão das bactérias alvo.

A Figura 32 apresenta um esquema comparativo entre o biocontrole convencional e a metodologia de biocontrole proposta neste trabalho, chamada aqui de “biocontrole modificado”. É demonstrada a diferente abordagem entre as principais etapas envolvidas no uso de fagos para o controle de crescimento bacteriano: isolamento, produção, purificação e tratamento.

Figura 32 Proposta de abordagem alternativa para o uso de fagos como ferramentas de biocontrole.



Enquanto na primeira abordagem o próprio hospedeiro alvo (Hosp A) é também utilizado para a produção do fago, o método modificado faz uso de um hospedeiro exclusivo para produção (Hosp P), o que se reflete na etapa de purificação, que no primeiro caso exige técnicas mais complexas que garantam a total separação entre fago e bactéria e, ainda assim, pode levar a dispersão de genes de resistência a antibiótico (GRA), quando for o caso de bactérias resistentes. Na etapa final, de tratamento, no lugar do fago ser aplicado na forma livre, desprotegido, ele passa a ser aplicado na forma de sistema fago/espório, evitando altos índices de decaimento que prejudiquem a efetividade do biocontrole.

Esta nova abordagem oferece o potencial para servir como complemento ou alternativa aos biocidas e desinfetantes regularmente utilizados nas etapas de desinfecção em sistemas de tratamento de efluente sanitários. Indo mais além, pode se tornar um forte aliado no controle de microrganismos problemáticos em plantas de tratamento de efluentes e estrutura associada.

5. CONCLUSÕES

- O método “isolamento sequencial por múltiplos hospedeiros” se mostrou eficiente na seleção de fagos com potencial para amplo espectro de hospedeiros, possibilitando isolar os fagos ϕ NA01 e ϕ NA03 ambos com indicativo de infectar bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas.
- É possível incorporar fagos capazes de infectar *Bacillus subtilis* a esporos em formação, porém, a eficiência de incorporação de cada fago é diferente, mesmo em condições experimentais iguais.
- Com a germinação dos esporos os fagos retomam seu ciclo lítico normalmente, liberando as partículas virais de sua progênie no meio e mantendo sua capacidade de infecção, com EOP semelhante a original, nos diferentes hospedeiros.
- O método em que é realizada a etapa de sincronização das células em esporulação provou ser mais eficiente na obtenção de um grande número de fagos incorporados aos esporos. Dentro deste método, condições experimentais como incubação líquida por 10 horas, MOI 1,0 aplicado no momento de interação entre fago e bactéria e 48 horas de maturação dos esporos garantiram o valor máximo de eficiência nos experimentos.
- Comprovou-se que, quando os fagos estão incorporados no interior de esporos bacterianos têm maior capacidade de tolerar diferentes condições físico-químicas, como temperaturas superiores a 50°C, valores de pH mais ácidos ou alcalinos, exposição à radiação UVA e diferentes concentrações de Cu^{+2} . Além disso, pode ser armazenado em temperatura ambiente por semanas sem perda considerável na viabilidade dos fagos.
- É possível induzir a germinação dos esporos, através de concentrações relativamente baixas de L-alanina ou da mistura AGFK, liberando a progênie de fagos em tempos menores que os comparados com a germinação não estimulada. O uso dos germinantes em conjunto garantem tempos ainda menores.
- Os resultados obtidos neste trabalho demonstram o potencial da abordagem de incorporação de fagos em esporos para garantir a eficácia do controle biológico com fagos em sistemas com condições adversas para a viabilidade das partículas virais.

6. REFERÊNCIAS

- ABEDON, S. T. Communication among Phages, Bacteria, and Soil Environments. *Biocommunication in Soil Microorganisms*, ed. Witzany G (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg), p. 37-65, 2011.
- ABULADZE, T.; LI, M.; MENETREZ, M. Y.; DEAN, T.; SENEAL, A.; SULAKVELIDZE, A. Bacteriophages Reduce Experimental Contamination of Hard Surfaces, Tomato, Spinach, Broccoli, and Ground Beef by *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, p. 6230-6238, 2008.
- AGRAWAL, A.; VANBROEKHOVEN, K.; LAL, B. Diversity of culturable sulfidogenic bacteria in two oil–water separation tanks in the north-eastern oil fields of India. *Anaerobe*, v. 16, p. 12–18, 2010.
- ACKERMANN, H. W.; TREMBLAY, D.; MOINEAU, S. Long-term bacteriophage preservation. *WFCC Newsletter*, v. 38, p. 35-40, 2004.
- ACKERMANN, H. W.; HELDAL, M. Basic electron microscopy of aquatic viruses. *In* S. W. Wilhelm, M. G. Weinbauer, Suttle CA (ed), *Manual of Aquatic Viral Ecology*. 2010.
- ADAMS M. H. Bacteriophages. Interscience Publishers, New York, 624p, 1959.
- ATLURI, S.; RAGKOUSI, K.; CORTEZZO, D. E.; SETLOW, P. Cooperativity between different nutrient receptors in germination of spores of *Bacillus subtilis* and reduction of this cooperativity by alterations in the GerB receptor. *Journal of Bacteriology*, v. 188, n. 1, p. 28-36, 2006.
- ARNDT, D.; GRANT, J.R.; MARCU, A.; SAJED, T.; PON, A.; LIANG, Y.; WISHART, D. S.; PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Research*, v. 44 (Web Server issue): p. W16-W21, 2016.
- ATTERBURY R. J., VAN BERGEN M. A. P., ORTIZ F. Bacteriophage Therapy To Reduce Salmonella Colonization of

Broiler Chickens. *Applied Environmental Microbiology*, v. 73(14), p. 4543–4549, 2007.

- AUAD L.; HOLGADO A.A.P.; FORSMAN P.; ALATOSSAVA T.; AND RAYA, R.R. Isolation and Characterization of a New *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* Temperate Bacteriophage. *Journal of Dairy Science*, v.80, p.2706-2712, 1997.
- AZEREDO, J.; SUTHERLAND, I. W. The use of phages for the removal of infectious biofilms. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, v.9, p. 261-266, 2008.
- AZIZIAN, R.; NASSER, A.; ASKARI, H.; TAHERI KALANI M, SADEGHIFARD N, PAKZAD I, et al. Sewage as a rich source of phage study against *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Biologicals*, v. 43(4), p. 238-41, 2015.
- BAQUERO, F.; MARTINEZ, J. L.; CANTON, R., Antibiotics and Antibiotic Resistance in Water Environments. *Current Opinion Biotechnology*, v. 19: 3, p. 260-265, 2008.
- BARLASS, P. J.; HOUSTON, C. W.; CLEMENTS, M. O.; MOIR, A. Germination of *Bacillus cereus* spores in response to L-alanine and to inosine: the roles of gerL and gerQ operon. *sc. Microbiology*, v. 148, p. 2089-2095, 2002.
- BARROW, P. A.; SOOTHILL, J. S. Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. *Trends Microbiology* v.7, p.268–271, 1997.
- BARTON, L. L.; FAUQUE, Guy D. Biochemistry, Physiology and Biotechnology of Sulfate-Reducing Bacteria. *Advances in applied microbiology*, v. 68, p. 41-98, 2009.
- BASTIN, E.S. The problem of the natural reduction of sulphates. *Bulletin of American Association Petroleum Geol.*, v. 10, p. 1270–1299, 1926.
- BHATTACHARJEE, A. S.; CHOI, J.; MOTLAGH, A. M.; MUKHERJI, S. T.; GOEL, R. Bacteriophage therapy for membrane biofouling in membrane bioreactors and antibiotic-resistant bacterial biofilms. *Biotechnology Bioengineering*, v. 112, n. 8, p. 1644-1654, 2015.

- BIELKE, L.; HIGGINS, S.; DONOGHUE, A.; DONOGHUE D.; HARGIS, B.M. Salmonella Host Range of Bacteriophages That Infect Multiple Genera. *Poultry Science*, v. 86, p.2536-2540, 2007.
- BOIVIN, J. W.; SHAPKA, R.; KHOURY, A. E.; BLENKINSOPP, S. AND COSTERTON, J. W. An old and a new method of control for biofilm bacteria. In: *Proceedings volume, Annual NACE Corrosion Conference (Corrosion 92)*, Nashville, TN, 1992.
- BOTTERO, S.; STORCK, T.; HEIMOVAARA, T.J.; LOOSDRECHT, M.C.M Van; ENZIEN, M.V.; PICIOREANU, C. Biofilm development and the dynamics of preferential flow paths in porous media. *Biofouling: the journal of bioadhesion and biofilm research*, v.29, n.9, p. 1069-1086, 2013.
- BOYD, E. F.; BRUSSOW, H. Common themes among bacteriophage encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved. *Trends in Microbiology*, v.10, p. 521–529, 2002.
- BRIDIER, A.; BRIANDET, R.; THOMAS, V.; DUBOIS-BRISSONNET, F. Comparative biocidal activity of peracetic acid, benzalkonium chloride and ortho-phthalaldehyde on 77 bacterial strains. *Journal of Hospital Infection*, v. 78, p. 208–213, 2011.
- BRUL, S.; VAN BEILEN, J.; CASPERS, M.; O'BRIEN, A.; DE KOSTER, C.; OOMES, S.; SMELT, J.; KORT, R.; TER BEEK, A. Challenges and advances in systems biology analysis of *Bacillus* spore physiology; molecular differences between an extreme heat resistant spore forming *Bacillus subtilis* food isolate and a laboratory strain. *Food Microbiology*, v. 28, n. 2, p. 221-227, 2011
- BURGESS, R. R.; TRAVERS, A. A.; DUNN, J. J.; BAUTZ, E. K. Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature*, v. 221, p. 43–46, 1969.
- BURGESS, R. M.; MORTON S.; STEPHENSON, T. Dinitrogen oxide detection for process failure early warning. E.; systems. *Water Science and Technology*, v.45, p. 247– 54, 2002.

- BURROUGHS, N. J.; MARSH, P.; WELLINGTON, E. M. H. Mathematical Analysis of Growth and Interaction Dynamics of *Streptomyces* and a Bacteriophage in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n.9, p. 3868-3877, 2000.
- CALENDAR, R.; R. INMAN. Phage biology. In: M. K. Waldor, D. I. Friedman, and S. L. Adhya (eds.), *Phages: Their Role in Bacterial Pathogenesis and Biotechnology*. ASM Press, Washington DC, 2005.
- CALENDAR, R. *The Bacteriophages*. New York: Plenum Press. Vol. 1. 1988.
- CAMPBELL, A. M.; Bacteriophages history, In: Kinipe D.M.; Howley P.M. *Filds Virology*, 5ªedição, v. 1(23), p. 771-772, 2007.
- CAREY-SMITH G. V.; BILLINGTON C.; CORNELIUS A. J.; HEINEMANN J. A. Isolation and characterization of bacteriophages infecting *Salmonella* spp. *FEMS Microbiology Letters*, v. 258, p.182–186, 2006.
- CARLTON, R. M.; NOORDMAN, W. H.; BISWAS, B.; MEESTER, E. D.; LOESSNER, M. J. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: Genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 43, p. 301-312, 2005.
- CARRILLO, L.C.; ATTERBURY, R.J.; EL-SHIBANY, A.; CORNNETON, P.L.; DILLON, E. et al. Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. *Applied Environmental Microbiology*, v. 71, p. 6554–6563, 2005.
- CASJENS, S. R.; GILCREASE E. B.; WINN-STAPLEY D. A., SCHICKLMAIER P., SCHMIEGER H., PEDULLA M. L., FORD M. E., HOUTZ J. M., HATFULL G. F., HENDRIX R.W. The generalized transducing *Salmonella* bacteriophage ES18: complete genome sequence and DNA packaging strategy. *Journal of Bacteriology*, v.187, p.1091–1104, 2005.
- CENENS, W.; MAKUMI, A.; MEBRHATU, M. T.; LAVIGNE, R.; AERTSEN, A. Phage–host interactions during pseudolysogeny:

Lessons from the *Pid/dgo* interaction. *Bacteriophage*, v. 3, n. 1, p. e25029, 2013.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Atlanta: How Poor Antibiotic Prescribing Puts Patients at Risk for Deadly Infections; 2014 Disponível em: <http://blogs.cdc.gov/cdcworksforyou/24-7/2014/03/how-poor-antibiotic-prescribing-puts-patients-at-risk-for-deadlyinfections/>.

CEYSSENS, P. J.; BRABBAN, A.; ROGGE, L.; LEWIS, M. S.; PICKARD, D. Molecular and physiological analysis of three *Pseudomonas aeruginosa* phages belonging to the "N4-like viruses". *Virology*, v. 405, 2010.

CHAN J. Z. M.; MILLARD, A. D.; MANN, N. H.; SCHÄFER, H. Comparative genomics defines the core genome of the growing N4-like phage genus and identifies N4-like Roseophage specific genes. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, p. 1–14, 2014.

CHAN, B. K.; ABEDON, S. T. Bacteriophages and their Enzymes in Biofilm Control. *Current Pharmaceutical Design*, v. 21, n. 1, p. 85-99, 2015.

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

CHEUNG, K. H.; GU, J. D. Reduction of chromate (CrO₄²⁻) by an enrichment consortium and an isolate of marine sulfate-reducing bacteria. *Chemosphere*, v. 52, p. 1523-1529, 2003.

CHIBANI-CHENNOUFI, S.; BRUTTIN, A.; DILLMANN, M. L.; BRUSSOW, H. Phage-host interaction: an ecological perspective, *Journal of Bacteriology*, v. 186, p. 3677-3686, 2004.

CLOKIE, M. R. J.; MILLARD, A. D.; LETAROV, A. V.; HEAPHY, S. Phages in nature. *Bacteriophage*, v. 1, n. 1, p. 31-45, 2011.

COIL, D.; JOSPIN, G.; DARLING, A. E. A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data. *Bioinformatics*, v. 31, n. 4, p. 587-589, 2015.

- COLOMBET, J.; ROBIN, A.; LAVIE, L.; BETTAREL, Y.; CAUCHIE, H. M.; SIME-NGANDO, T. Virioplankton 'pegylation': Use of PEG (polyethylene glycol) to concentrate and purify viruses in pelagic ecosystems. *Journal of Microbiological Methods*, v. 71, p. 212-219, 2007.
- CONDON, S.; BAYARTE, M.; SALA, J. F. Influence of the sporulation temperature upon the heat resistance of *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 73, p. 251-256, 1992.
- CORNELISSEN, A.; CEYSSSENS, P. J.; T'SYEN, J.; VAN PRAET, H.; NOBEN, J. P.; SHABUROVA, O. V. The T7-related *Pseudomonas putida* phage phi15 displays virion-associated biofilm degradation properties. *PLOS ONE*, v. 6, e18597, 2011.
- CRAUN, G. F.; CALDERON, R. L.; CRAUN, M. F. Outbreaks associated with recreational water in the United States. *Int. J. Environmental Health Research*, v. 15, p. 243-262, 2005.
- CULLEY, G. F. S. A. I. Extraction and purification of nucleic acids from viruses, in *Manual of Aquatic Viral Ecology* ASLO, Editor, ASLO: Waco-TX. p. 154-165, 2010.
- CURTIS, T. P.; SLOAN, W. T.; SCANNELL, J. W. Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of National Academy of Science USA*, v. 99, n.16, p. 10494-10499, 2002.
- DANIS-WŁODARCZYK, K.; OLSZAK, T.; ARABSKI, M.; WASIK, S.; MAJKOWSKA-SKROBEK, G.; AUGUSTYNIAK, D.; GULA, G.; BRIERS, Y.; JANG, H. B.; VANDENHEUVEL, D.; DUDA, K. A.; LAVIGNE, R.; DRULIS-KAWA, Z. Characterization of the Newly Isolated Lytic Bacteriophages KTN6 and KT28 and Their Efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm. *PLOS ONE*, v. 10, n. 5, p. e0127603, 2015.
- DAVIS, J. P.; STRUCHTEMEYER, C. G.; ELSHAHED, M. S. Bacterial communities associated with production facilities of two newly drilled thermogenic natural gas wells in the Barnett Shale (Texas, USA). *Microbiology Ecology*, v. 64, n. 4, p. 942-54, 2012.
- DAVYDOVA, E. K.; KAGANMAN, I.; KAZMIERCZAK, K. M.; ROTHMAN-DENES, L. B. Identification of Bacteriophage N4

- Virion RNA Polymerase-Nucleic Acid Interactions in Transcription Complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 284, n. 4, p.1962-1970, 2009.
- DEFRA. Consultation paper: proposals to amend the statutory controls for the agricultural use of sewage sludge. Department of Environment, Food and Rural, Affairs (DEFRA) and Welsh, Assembly Government, October 2002.
- DELBRUCK, M. Adsorption of bacteriophages under various physiological conditions of the host. *Journal of Physiological Chemistry*, v. 23, p. 631–642, 1940.
- DOE, U. Modern shale gas development in the United States: A primer. Office of Fossil Energy and National Energy Technology Laboratory, United States Department of Energy, 2009.
- DANOVARO R., MIDDELBOE M. Separation of free virus particles from sediments in aquatic systems. In S. W. Wilhelm, M. G. Weinbauer, Suttle CA (ed), *Manual of Aquatic Viral Ecology*, 2010.
- DONLAN, R. M.; COSTERTON J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, v.15, p. 167-193, 2002.
- DRIKS, A. Maximum shields:the assembly and function of the bacterial spore coat. *TRENDS in Microbiology*, v.10, n. 6, 2002.
- ECKFORD, R. E.; FEDORAK, P. M. Planktonic nitrate-reducing bacteria and sulfate reducing bacteria in some western Canadian oilfield waters. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 29, p. 83–92, 2002.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, v.32, n. 5, p. 792-1797, 2004.
- ELLIS, E.; DELBRUCK, M. The Growth of Bacteriophage. *The Journal of General Physiology*, v. 22 (3), p. 365–384, 1939.
- ENAV, H.; BEJA, O.; MANDEL-GUTFREUND, Y. Cyanophage tRNAs may have a role in cross-infectivity of oceanic

Prochlorococcus and Synechococcus hosts. *ISME J* , v. 6, n. 3, p. 619-628, 2012.

ERRINGTON, J. A complex four-gene operon containing essential cell division gene *pbpB* in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, v. 178, p. 2343–2350, 1996.

EYDAL, H. S. C.; JAGEVALL, S.; HERMANSSON, M.; PEDERSEN, K. Bacteriophage lytic to *Desulfovibrio aespoensis* isolated from deep groundwater. *International Society for Microbial Ecology Journal*, v. 3, p. 1139-1147, 2009.

FARMER, N. G.; WOOD, T. L.; CHAMAKURA, K. R.; KUTY EVERETT, G. F. Complete Genome of *Acinetobacter baumannii* N4-Like Podophage Presley. *Genome Announcements* 1(6):e00852-00813, 2013.

FENG, Y. Y. ONG, S.L.; HU, J. Y.; TAN, X. L. Effects of pH and temperature on the survival of coliphages MS2 and Q β . *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 30, n. 9, p. 549-552, 2003.

FIELD, C. B.; BEHRENFELD, M. J.; RANDERSON, J. T.; FALKOWSKI, P. Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. *Science*, v. 281, n. 5374, p. 237-240, 1998.

FIMLAID, K. A.; SHEN, A. Diverse mechanisms regulate sporulation sigma factor activity in the Firmicutes. *Current opinion in microbiology*, v. 24, p. 88-95, 2015.

FOUTS, D. E.; KLUMPP, J.; BISHOP-LILLY, K. A.; RAJAVEL, M.; WILLNER, K. M.; BUTANI, A. Whole genome sequencing and comparative genomic analyses of two *Vibrio cholerae* O139 Bengal-specific Podoviruses to other N4-like phages reveal extensive genetic diversity. *Virology Journal*, v. 10, p.165, 2013.

FOSTER, T. J. Immune evasion by staphylococci. *Nature Reviews in Microbiology*, v.3, p. 948–958, 2005.

FRANKLIN, R. B.; TAYLOR, D. R.; MILLS, A. L. Characterization of microbial communities using Randomly Amplified

- Polymorphic DNA (RAPD). *J. Microbiology Methods*, v. 35, p. 225–235, 1999.
- FITRIDGE, I.; DEMPSTER, T.; GUENTHER, J.; DE NYS, R. The impact and control of biofouling in marine aquaculture: A review. *Biofouling*, v. 28, 649–669, 2012.
- GARDNER, L. R.; STEWART, P. S. Action of glutaraldehyde and nitrite against sulfate-reducing bacterial biofilms. *Journal of Industrial Microbial Biotechnology*, v.29, p. 354–360, 2002.
- GARCIA, H. I.; RODRIGUEZ-VALERA, F.; MARTIN-CUADRADO, A. B. Novel group of podovirus infecting the marine bacterium *Alteromonas macleodii*. *Bacteriophage*, v. 3 (2), e24766, 2013.
- GARCÍA, P.; MADERA, C.; MARTÍNEZ, B.; RODRÍGUEZ, A. Biocontrol of *Staphylococcus aureus* in curd manufacturing processes using bacteriophages. *International Dairy Journal*, v. 17, n. 10, p. 1232-1239, 2007.
- GIEG, L. M.; JACK, T. R.; FOGHT, J. M. Biological souring and mitigation in oil reservoirs. *Applied Microbial Biotechnology*, v.92, p. 263-282, 2011.
- GILL, J. J.; HYMAN, P. Phage Choice, Isolation, and Preparation for Phage Therapy. *Current pharmaceutical biotechnology*, v.11, p. 2-14. 2010.
- GIORNO, R.; BOZUE, J.; COTE, C.; WENZEL, T.; SULAYMAN, M.; KRISHNA, M.; MICHAEL, R. M.; WANG, R.; ZIELKE, R. R.; MADDOCK, J.; FRIEDLANDER, A.; WELKOS, S.; DRIKS, A. Morphogenesis of the *Bacillus anthracis* Spore. *Journal of bacteriology*, v. 189, n. 30021-9193, p. 691–705, 2007.
- GITTEL, A.; SORENSEN, B. K.; SKOVHUS, T. L.; INGVORSEN, K.; SCHRAMM, A. Prokaryotic community structure and sulfate reducer activity in water from high-temperature oil reservoirs with and without nitrate treatment. *Applied Environmental Microbiology*, v. 75, p. 7086-96, 2009.
- GOODRIDGE, L. D.; BISHA, B. Phage-based biocontrol strategies to reduce foodborne pathogens in foods. *Bacteriophage*, v. 1(3), p. 130-137, 2011.

- GRANT J. R.; STOTHARD P. The CGView Server: a comparative genomics tool for circular genomes. *Nucleic Acids Research*, v. 36, p.W181-W184, 2008.
- GU, J.; LIU, X.; LI, Y.; HAN, W.; LEI, L.; YANG, Y.; ZHAO, H.; GAO, Y.; SONG, J.; LU, R.; SUN, C.; FENG, X. A Method for Generation Phage Cocktail with Great Therapeutic Potential. *Plos One*, v. 7, e31698, 2012.
- GUTIERREZ D.; MARTIN-PLATERO A. M., RODRIGUEZ A., MARTINEZ-BUENO M., GARCIA P., MARTINEZ B. Typing of bacteriophages by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR to assess genetic diversity. *FEMS Microbiology Letter*, v. 322, p. 90-97, 2011.
- GUTIÉRREZ, D.; VANDENHEUVEL, D.; MARTÍNEZ, B.; RODRÍGUEZ, A.; LAVIGNE, B.; GARCÍA, P. Two Phages, phiIPLA-RODI and phiIPLA-C1C, Lyse Mono- and Dual Species Staphylococcal Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 81(10): p. 3336-3348, 2015.
- HANDA, T.; LIM, C. P.; TAKASE, Y.; MIYANAGA, K.; TOMOE, Y.; TANJI, Y. Microbial and chemical characterizations of oil field water through artificial souring experiment. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, v.43, p. 792–797, 2010.
- HALL, B. G. Predicting the evolution of antibiotic resistance genes. *Nature Reviews Microbiology*, v. 2(5), p. 430–435, 2004.
- HALL, H. D. Mutants of T4 unable to induce dihydrofolate reductase activity. *Proceedings of the National Academy of Science*, v. 58, p. 584-591, 1967.
- HAGENS, S.; LOESSNER, M.J. Application of bacteriophages for detection and control of foodborn pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 76(3), p. 513-519, 2007.
- HAMMAD, A. M. M. Evaluation of alginate-encapsulated *Azotobacter chroococcum* as a phage-resistant and an effective inoculum. *Journal of Basic Microbiology*, v. 38, p. 9–16, 1998.
- HANTULA, J.; KURKI, A.; VUORIRANTA, P.; BAMFORD, D.H.; Ecology of bacteriophages infecting activated sludge bacteria.

- Applied and Environmental Microbiology, v. 8, p. 2147-2151, 1991.
- HANKIN, M.E. Les microbes des rivières de l'Inde. Annual Institute Pasteur (Paris), v.10, p. 175–176, 1896.
- HARMS, G.; LAYTON, A. C.; DIONISI, H. M.; GREGORY, I. R.; GARRETT, V. M.; HAWKINS, S. A.; ROBINSON, K. G.; SAYLER, G. S. Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant. Environmental Science and Technology, v. 37 (2), p. 343-351, 2003.
- HATFULL, G. F. Bacteriophage genomics. Current Opinion in Microbiology, v. 11, p. 447-53, 2008.
- HEINEMAN, R. H.; SPRINGMAN, R.; BULL, J. J. Optimal Foraging by Bacteriophages through Host Avoidance. The American Naturalist, v. 171, p. 149-157, 2008.
- HENDRIX, R. W.; SMITH, M. C. M.; BURNS, R. N.; FORD, M. E.; HATFULL, G. F. Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: All the world's a phage. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 96, n. 5, p. 2192-2197, 1999.
- HENRY, M.; BISWAS, B.; VINCENT, L.; MOKASHI, V.; SCHUCH R., LILLY, KA. Development of a high throughput assay for indirectly measuring phage growth using the OmniLog(TM) system. Bacteriophage, v. 2, p. 159-67, 2012.
- HÉRELLE, F.; SMITH, G. H. The Bacteriophage: Its Role in Immunity. Baltimore, MD: Williams and Wilkins Co., Waverly Press; 1922.
- HERELLE, F.; RAKIETEN, M. L. The susceptibility of hemolytic staphylococci to bacteriophage. Journal of the American Medical Association, v. 100, n. 13, p. 1014-1014, 1933.
- HETTENBACH, T.; COHEN, B.; WILES, R.; COOK, K. Environmental working group report. April. Dumping Sewage Sludge on Organic Farms? Q Washington DC, 1998.

- HOYLAND-KROGHSBO, N.M.; MAERKEDAHL, R.B.; SVENNINGSEN, S. L. A quorum-sensing-induced bacteriophage defense mechanism. *MBio Journal*, v. 4, e00362-12, 2013.
- HU, J.; MIYANAGA, K.; TANJI, Y. Diffusion of bacteriophages through artificial biofilm models. *Biotechnology Progress*, v. 28, p. 319-326, 2012.
- HYMAN P.; ABEDON S. T. Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Advances in Applied Microbiology*, v.70, p. 217–248, 2010.
- IRIARTE F. B.; BALOGH, B.; MOMOI, M.T.; SMITH, L.M. Factors affecting survival of bacteriophage on tomato leaf surfaces. *Applied Environmental Microbiology*, V. 73, p. 1704–1711, 2007.
- JAHN, J.; VAN DEN BOS, P.; VAN DEN BROEKE L. Evaluation of Membrane Processes for Acid Gas Treatment. In: *SPE International Production and Operations Conference & Exhibition*, Netherlands, 2012.
- JANEZ, N.; CARRILLO, C.L. Use of phages to control *Campylobacter* spp. *Journal of Microbial Methods*, v. 95 (1), p. 68-75, 2013.
- JENSEN, E. C.; SCHRADER, H. S.; RIELAND, B.; THOMPSON, T. L.; LEE, K. W.; NICKERSON, K. W.; KOKJOHN, T. A. Prevalence of Broad-Host-Range Lytic Bacteriophages of *Sphaerotilus natans*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, p. 575-580, 1998.
- JIA, F.; PIGNATARO, L.; SCHOFIELD, C. M.; YUE, M.; HARRISON, N. L.; GOLDSTEIN, P. A. An extrasynaptic GABAA receptor mediates tonic inhibition in thalamic VB neurons. *Journal of Neurophysiology*, v. 94:4491–4501, 2005.
- JOHNSON, R. P.; GYLES, C. L.; HUFF, W. E.; OJHA, S.; HUFF, G. R.; RATH, N. C.; DONOGHUE, A. M. Bacteriophages for prophylaxis and therapy in cattle, poultry and pigs. *Animal Health Research Reviews*, v. 9(2), p. 201-215, 2008.

- JOŃCZYK, E.; KŁAK M., MIĘDZYBRODZKI R. & GÓRSKI A. The influence of external factors on bacteriophages—review. *Folia Microbiology*, v.56, 191–200, 2011.
- KALYUZHNYI, S. V.; FEDOROVICH, V. V. Mathematical modelling of competition between sulphate reduction and methanogenesis in anaerobic reactors. *Bioresources Technology*, v.65, p.227–242 1998.
- KASMAN, L. M.; KASMAN, A.; WESTWATER, C.; DOLAN J.; SCHMIDT M.G.; NORRIS, J.S. Overcoming the Phage Replication Threshold: a Mathematical Model with Implications for Phage Therapy. *Journal of Virology*, v. 76, p. 5557-5564. 2002.
- KAWAMURA, F.; ITO, J. Bacteriophage gene expression in sporulating cells of *Bacillus subtilis* 168. *Virology Journal*, v. 62, n. 2, p. 414-425, 1974.
- KELLAND, M.A. Production chemicals for the oil and gas industry. Boca Raton: CRC Press., xvii, 437 p., 2009.
- KHAN, M. A.; SATOH, H.; KATAYAMA, H.; KURISU. Bacteriophages isolated from activated sludge processes and their polyvalency. *Water Research*, v.36 (13), p. 3364-70, 2002.
- KILJUNEN, S. *et al.* Identification of the lipopolysaccharide core of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* as the receptor for bacteriophage phiA1122. *Journal of Bacteriology*, v. 193, p. 4963–4972, 2011.
- KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J. E. *Virus Taxonomy*. Ninth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Elsevier, San Diego. 2012.
- KNEZEVIC, P.; KOSTANJSEK, R.; OBREHT, D.; PETROVIC, O. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* Specific Phages with Broad Activity Spectra. *Current Microbiology*, v. 59, p.173-180, 2012.
- KNIEMEYER, O.; MUSAT, F.; SIEVERT, S. M.; KNITTEL, K.; WILKES, H.; BLUMENBERG, M.; MICHAELIS, W.; CLASSEN, A.; BOLM, C.; JOYE, S.B.; WIDDEL, F.

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

- KONG, M.; RYU, S. Bacteriophage PBC1 and Its Endolysin as an Antimicrobial Agent against *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 81, n. 7, p. 2274-2283, 2015.
- KOSKELLA, B.; BROCKHURST, M.A. Bacteria–phage coevolution as a driver of ecological and evolutionary processes in microbial communities. *Fems Microbiology Reviews*, v.38(5), p.916-931, 2014.
- KORT, R.; O'BRIEN, A. C.; VAN STOKKUM, I. H. M, et al. Assessment of Heat Resistance of Bacterial Spores from Food Product Isolates by Fluorescence Monitoring of Dipicolinic Acid Release. *Applied and Environmental Microbiology*, v.1 (7), p. 3556-3564, 2005.
- KROPINSKI A.M. Measurement of the Rate of Attachment of Bacteriophage to Cells. *In* Martha R. J. Clokie, Kropinski A.M. Bacteriophages. Humana Press, p. 151-155, 2009.
- KUMAR, V.; BALAJI, S.; GOMATHI, N. S.; VENKATESAN, P.; SEKAR, G.; JAYASANKAR, K.; NARAYANAN, P. R. Phage cocktail to control the exponential growth of normal flora in processed sputum specimens grown overnight in liquid medium for rapid TB diagnosis. *Journal for Microbiology Methods*, v. 68, p. 536–542, 2007.
- KUTTER E. Phage Host Range and Efficiency of Plating. *In* Martha R. J. Clokie, Kropinski AM (ed), Bacteriophages, vol 1. Humana Press, p. 141-149, 2009.
- LABRIE, S. J.; SAMSON, J. E.; MOINEAU, S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, v. 8, p. 317–327, 2010.
- LECHNER, M, et al. Proteinortho: Detection of (Co-)orthologs in large-scale analysis. *MC Bioinformatics*, v. 12, p.124-124, 2011.
- LEE, W. J.; BILLINGTON, C.; HUDSON, J. A.; HEINEMANN, J. A. Isolation and characterization of phages infecting *Bacillus*

- cerus. *Letters in Applied Microbiology*, v. 52, n. 5, p. 456-464, 2011.
- LIN, L.; HAN, J.; JI, X.; HONG, W.; HUANG, L.; WEI, Y. Isolation and characterization of a new bacteriophage MMP17 from *Meiothermus*. *Extremophiles*, v. 15, p. 253-258, 2011.
- LI, E.; WEI, X.; MA, Y.; YIN, Z.; LI, H.; LIN, W.; ZHAO, X. Isolation and characterization of a bacteriophage phiEap-2 infecting multidrug resistant *Enterobacter aerogenes*. *Scientific Reports*, 6, 28338, 2016.
- LIU, M.; GILL, J. J.; YOUNG, R.; SUMMER, E. J. Bacteriophages of wastewater foaming-associated filamentous *Gordonia* reduce host levels in raw activated sludge. *Scientific Reports*, v. 5, p. 135-154, 2015.
- LOGAN, N. A. and DE VOS, P. Genus I. *Bacillus* Cohn 1872, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 174AL. Vol 3. The firmicutes, 2nd Edition, 2009.
- LOWE, T. M.; EDDY, S. R. tRNAscan-SE: A Program for Improved Detection of Transfer RNA Genes in Genomic Sequence. *Nucleic Acids Research*, v.25, p. 0955-0964, 1997.
- LY-CHATAIN, M. H. The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, (51), 2014.
- ŁOŚ, M.; WEGRZYN, G.; NEUBAUER, P. A role for bacteriophage T4 rI gene function in the control of phage development during pseudolysogeny and in slowly growing host cells. *Research in Microbiology*, v. 154, p. 547-552, 2003.
- ŁOŚ, M.; WĘGRZYN, G. Chapter 9 - Pseudolysogeny. In: ŁOBOCKA, M. e SZYBALSKI, W. T. (Ed.). *Advances in Virus Research*: Academic Press, v.82, p.339-349, 2012.
- LU, Z.; BREIDT, F. J.; FLEMING, H. P.; ALTERMANN, E.; KLAENHAMMER, T. R. Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage, phiJL-1, from a cucumber fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, v. 84, p. 225-235, 2003.

- LU, T. K.; KOERIS, M. S. The next generation of bacteriophage therapy. *Current Opinion Microbiology*, v. 14(5), p. 524–531, 2011.
- LU, M. J.; HENNING, U. Superinfection exclusion by T-even-type coliphages. *Trends in Microbiology*, v. 2, 137–139, 1994.
- LUU, S.; CRUZ-MORA, J.; SETLOW, B.; FEEHERRY, F. E.; DOONA, C.J.; SETLOW, P. The effects of heat activation on *Bacillus* spore germination, with nutrients or under high pressure, with or without various germination proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 81, n. 8, p. 2927-2938, 2015.
- MACHEL, H. G.; KROUSE, H. R.; SASSEN, R. Products and distinguishing criteria of bacterial and thermochemical sulfate reduction. *Applied geochemistry*, v.10, n. 4, p. 373-389, 1995.
- MADONI, P.; DAVOLI, D.; GIBIN, G. Survey of filamentous microorganisms from bulking and foaming activated-sludge plants in Italy. *Water Research*, v. 34, p.1767– 1772, 2000.
- MAGGE, A. et al. Role of dipicolinic acid in the germination, stability, and viability of spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, v. 190, n. 14, p. 4798-4807, 2008.
- MAGOT, M.; OLLIVIER, B.; PATEL, B. K. C. Microbiology of petroleum reservoirs. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, v. 77, p. 103-116, 2000.
- MA, Y.; LI, E.; QI, Z.; LI, H.; WEI, X.; LIN, W.; ZHAO, R.; ... ZHAO, X. Isolation and molecular characterization of *Achromobacter* phage phiAxp-3, an N4-like bacteriophage. *Scientific Reports*, v.6, 24776, 2016.
- MAMANE, H.; SHEMER, H.; LINDEN, K.G. Inactivation of *E. coli*, *B. subtilis* spores, and MS2, T4, and T7 phage using UV/H2O2 advanced oxidation. *Journal of Hazard Materials*, v. 146(3), p. 479-486, 2007.
- MARCÓ, M. B.; REINHEIMER, J. A.; QUIBERONI, A. Phage adsorption to *Lactobacillus plantarum*: Influence of

- physiological and environmental factors. *International Journal of Food Microbiology*, v. 138 (3), p. 270-275, 2010.
- MAREI, E. M. Isolation and Characterization of *Bacillus subtilis* Phage from Soil Cultivated with Liquorices Root. *International Journal of Microbiological Research*, v. 4(1), p.43-49, 2013.
- MARSH, P.; WELLINGTON, E.M.H. Phage-host interactions in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 15, p. 99-107, 1994.
- MARTINS A. M. P.; PAGILLA, K.; HEIJNEN, J. J.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Filamentous bulking sludge—a critical review. *Water Research*, v.38, p.793– 817, 2004.
- MATEUS, L.; COSTA, L.; SILVA, Y. J.; PEREIRA, C.; CUNHA, A.; ALMEIDA, A. Efficiency of phage cocktails in the inactivation of *Vibrio* in aquaculture. *Aquaculture*, v.424–425, p. 167–173, 2014.
- MAHONY, J.; MCAULIFFE, O.; ROSS, R. P.; VAN SINDEREN, D. Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 22(2), p. 157–163, 2011.
- MCKENNEY, P. T.; DRIKS, A.; EICHENBERGER, P. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews Microbiology*, v. 11, p. 33, 2012.
- MEIJER, W. J.; CASTILLA-LLORENTE, V.; VILLAR, L.; MURRAY, H.; ERRINGTON J.; SALAS, M. Molecular basis for the exploitation of spore formation as survival mechanism by virulent phage ϕ 29. *The EMBO Journal*, v. 24(20), p. 3647-3657, 2005.
- MICHAEL, I.; RIZZO, L.; MCADELL, C. S.; MANAIA, C. M.; MERLIN, C.; SCHWARTZ, T.; et al. Urban waste water treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: a review. *Water Research*, v. 47, p. 957–993, 2013.
- MIDDELBOE, M.; CHAN, A. M.; BERTELSEN, S. K. Isolation and life cycle characterization of lytic viruses infecting heterotrophic bacteria and cyanobacteria. In S.W. Wilhelm, M. G. Weinbauer, Suttle CA (ed), *Manual of Aquatic Viral Ecology*, 2010.

- MISSTEAR, D. B.; GILL, L. W. The inactivation of phages MS2, Φ X174 and PR772 using UV and solar photocatalysis. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, v. 107, p. 1-8, 2012.
- MOAK, M.; MOLINEUX, I. J. Role of the Gp16 lytic transglycosylase motif in bacteriophage T7 virions at the initiation of infection. *Molecular Microbiology* v. 37, p. 345–355, 2000.
- MOLDOVAN, R.; CHAPMAN-MCQUISTON, E.; WU, X. On kinetics of phage adsorption. *Biophysics Journal*, v. 93, p. 303–315, 2007.
- MOLINEUX, I. J. Host-parasite interactions: recent developments in the genetics of abortive phage infections. *New Biology*, v. 3, p. 230–236, 1991.
- MONGKOLTHANARUK, W. et al. Effect of amino acid substitutions in the GerAA protein on the function of the alanine-responsive germinant receptor of *Bacillus subtilis* spores. *Journal of Bacteriology*, v. 193, n. 9, p. 2268-2275, 2011.
- MULLER H. J. The relation of recombination to mutational advance. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 1, n.1, p. 2-9, 1964.
- MÜLLER-MERBACH, M.; RAUSCHER, T.; HINRICHS, J. Inactivation of bacteriophages by thermal and high-pressure treatment. *International Dairy Journal*, v. 15, n. 6, p. 777-784, 2005.
- MURAKAMI, K. S.; DAVYDOVA, E. K.; ROTHMAN-DENES, L. B. X-ray crystal structure of the polymerase domain of the bacteriophage N4 virion RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 105(13), p. 5046-5051, 2008.
- NAGLER, K.; SETLOW, P.; LI, Y. Q.; MOELLER, R. High salinity alters the germination behavior of *Bacillus subtilis* spores with nutrient and nonnutrient germinants. *Applied and Environmental Microbiology*, v.80(4), p. 1314-1321, 2014.
- NGUYEN, T. M. H.; DURAND, A.; LOISON, P.; PERRIER-CORNET, J-M.; GERVAIS, P. Effect of sporulation conditions on the resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat and high

- pressure. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 90, n. 4, p. 1409-1417, 2011.
- NIALL, A. L.; HALKET, G. Developments in the taxonomy of aerobic, endospore forming Bacteria. *Endospore forming soil bacteria*, v. 27, p. 1-7, 2011.
- NICHOLSON, W.L.; MUNAKATA, N.; HORNECK, G.; MELOSH, H.J.; SETLOW, P. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology*, v. 64, p. 548–572, 2000.
- NICHOLSON, W.L.; SCHUERGER, A.C.; SETLOW, P. The solar UV environment and bacterial spore UV resistance: considerations for Earth-to-Mars transport by natural processes and human spaceflight. *Mutation Research*, v. 571, 249–264, 2005.
- NICHOLSON, W.L.; SETLOW, P. Sporulation, germination and outgrowth. In: Harwood CR, Cutting SM, editors. *Molecular biological methods for Bacillus*. Chichester (United Kingdom): Wiley. pp. 391–450, 1990.
- NIKAIDO, H. Multidrug resistance in bacteria. *Annu Rev Biochem*, p.119–146, 2009.
- O'FLYNN, R. P.; ROSS, G. F.; FITZGERALD, B.; COFFEY, A. Evaluation of a Cocktail of Three Bacteriophages for Biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, n. 6, p. 3417–3424, 2004.
- O'NEILL, J. The review on antimicrobial resistance, tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. 2016. https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf (acessado em 01/04/2018).
- ORLOVA, E. V. Bacteriophages and Their Structural Organisation. In *Bacteriophages*. Intech, p 1-30, 2012.
- ORMALA A. M.; JALASVUORI M. Phage therapy: should bacterial resistance to phages be a concern, even in the long run? *Bacteriophage* 3:e24219, 2013.
- PANTŮČEK, R.; ROSYPALOVÁ, A.; DOŠKAŘ, J.; KAILEROVÁ, J.; RŮŽIČKOVÁ, V.; ROSYPAL, S., et al. The Polyvalent

Staphylococcal Phage ϕ 812: Its Host-Range Mutants and Related Phages. *Virology*, v. 246 (2), p. 241-252, 1998.

- PAREDES-SABJA, D.; SETLOW, P.; SARKER, M. S. Germination of spores of *Bacillales* and *Clostridiales* species: mechanisms and proteins involved. *Trends in Microbiology*, v. 19(2), p. 85-94, 2011.
- PARK, M.; LEE, JH.; SHIN, H.; KIM, M.; CHOI, J.; KANG D-H.; HEU, S.; RYU, S. Characterization and comparative genomic analysis of a novel bacteriophage, SFP10, simultaneously inhibiting both *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, p. 58-69, 2012.
- PERRY, L. L. et al. Sequence analysis of *Escherichia coli* O157:H7 bacteriophage Φ V10 and identification of a phage-encoded immunity protein that modifies the O157 antigen. *FEMS Microbiology Letters*, v. 292, n. 2, p. 182-186, 2009.
- PIGGOT, P. J.; LOSICK, R. Sporulation genes and intercompartmental regulation. In *Bacillus subtilis and Its Closest Relatives: From Genes to Cells*, A.L. Sonenshein, J.A. Hoch, and R. Losick, eds. (Washington, DC: American Society for Microbiology), p. 483–518, 2002.
- PIRES D., S. SILLANKORVA, A. FAUSTINO, J. AZEREDO Use of newly isolated phages for control of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and ATCC 10145 biofilms *Res Microbiol*, v.162, p. 798–806, 2011.
- POPHAM, D.L.; SENGUPTA, S.; SETLOW, P. Heat, hydrogen peroxide, and UV resistance of *Bacillus subtilis* spores with increased core water content and with or without major DNA-binding proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61(10), p.3633-3638, 1995.
- POULLAIN V.; GANDON S.; BROCKHURST M. A.; BUCKLING A.; HOCKBERG M. E. The evolution of specificity in evolving and co-evolving antagonistic interactions between a bacteria and its phage. *Evolution*, v. 62, p.1-11, 2008.

- POULLIS, D. A., R. W. ATTWELL, AND S. C. POWELL. The characterization of waterborne-disease outbreaks. *Reviews in Environmental Health*, n.20 p.141–149, 2005.
- PRUDEN, A.; LARSSON, D. G. J.; AMEZQUITA, A.; COLLIGNON, P.; BRANDT, K. K.; GRAHAM, D. W.; LAZORCHAK, J. M.; SUZUKI, S.; SILLEY, P.; SNAPE, J. R.; TOPP, E.; ZHANG, T.; ZHU, Y.-G., Management Options for Reducing the Release of Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes to the Environment. *Environmental Health Perspectives*, v. 121(8), p. 878-885, 2013.
- PEREYRA, L.; HIIBEL, S.; PRIETO RIQUELME, M. V.; REARDON, K.; PRUDEN, A. Detection and quantification of functional genes of cellulose-degrading, fermentative, and sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea. *Applied Environmental Microbiology*, v. 76, p. 2192–2202, 2010.
- RAKHUBA, D. V.; KOLOMIETS, E. I.; DEY, ESTERA LU AND NOVIK, G. I. Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Polish Journal of Microbiology*, v. 59(3), p.145-155, 2010.
- RIESENMAN, P.J.; NICHOLSON, W.L. Role of the Spore Coat Layers in *Bacillus subtilis* Spore Resistance to Hydrogen Peroxide, Artificial UV-C, UV-B, and Solar UV Radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66(2), p. 620-626, 2000.
- RIPP, S.; MILLER, R. V. The role of pseudolysogeny in bacteriophage-host interactions in a natural freshwater environment. *Microbiology*, v. 143, n. 6, p. 2065-2070, 1997.
- ROHWER, F.; EDWARDS, R. The phage proteomic tree: a genome based taxonomy for phage. *Journal of Bacteriology*, v. 184, p. 4529–4535, 2002.
- ROSS, A.; WARD, S.; HYMAN, P. More Is Better: Selecting for Broad Host Range Bacteriophages. *Frontiers in Microbiology*, v 7, p.1352, 2016.
- RÖLING, W. F. M.; HEAD, I. M.; LARTER, S. R. The microbiology of hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs:

perspectives and prospects. *Research in Microbiology*, v.154, p. 321–328, 2003.

- ROTHMAN-DENES, L. B.; SCHITO, G. C. Novel transcribing activities in N4-infected *Escherichia coli*. *Virology*, v.60, p.65-72, 1964.
- SABOUR, P. M.; GRIFFITHS, M. W. Bacteriophages in the control of food- and waterborne pathogens, ASM Press, Washington, DC, 2010.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning, v. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1989.
- SAMSON, J. E.; MAGADÁN, A. H.; SABRI, M., MOINEAU, S. Revenge of the phages: defeating bacterial defenses. *Nature Reviews in Microbiology*, v. 11, p. 675–687, 2013.
- SANCHEZ-SALAS, J. L.; SETLOW, B.; ZHANG, P.; LI, Y.; SETLOW, P. Maturation of Released Spores Is Necessary for Acquisition of Full Spore Heat Resistance during *Bacillus subtilis* Sporulation . *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77 (19), p. 6746-6754, 2011.
- SCHÄFFER, C.; WUGEDITSCH, T.; NEUNINGER, C.; MESSNER, P. Are S-layer glycoproteins and lipopolysaccharides related? *Microbial Drug Resistance*, v. 2(1), p. 17-23, 1996.
- SCHIJVEN, J. F.; SADEGHI, G.; HASSANIZADEH, S. M. Long-term inactivation of bacteriophage PRD1 as a function of temperature, pH, sodium and calcium concentration. *Water Research*, v. 103, p. 66-73, 2016.
- SEALE, R. B.; FLINT, S. H.; MCQUILLAN, A .J.; BREMEM, P.J. Recovery of Spores from Thermophilic Dairy Bacilli and Effects of Their Surface Characteristics on Attachment to Different Surfaces. *Applied and environmental microbiology*, v. 74, p. 731–737, 2008.
- SELLA, S. R. B. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. Life cycle and spore resistance of spore-forming *Bacillus atrophaeus*. *Microbiological Research*, v. 169, n. 12, p. 931-939, 2014.

- SETLOW, P. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology*, v. 101, n. 3, p. 514-525, 2006.
- SETLOW, P. Germination of spores of *Bacillus* species: what we know and do not know. *Journal of Bacteriology*, v. 196, n. 7, p. 1297-1305, 2014.
- SETLOW, P. Spore resistance properties. *Microbiol Spectr*, v. 2, n. 5, 2014.
- SETLOW, B.; LOSHON, C. A.; GENEST, P. C.; COWAN, A. E.; SETLOW, C.; SETLOW, P. Mechanisms of killing spores of *Bacillus subtilis* by acid, alkali and ethanol. *Journal of Applied Microbiology*, v. 92, n. 2, p. 362-375, 2002.
- SHAO, Y.; WANG, I.-N. Bacteriophage Adsorption Rate and Optimal Lysis Time. *Genetics*, v. 180, n. 1, p. 471-482, 2008.
- SILLANKORVA, S.; NEUBAUER, P.; AZEREDO, J. Phage control of dual species biofilm of *Pseudomonas fluorescens* and *Staphylococcus lentus*. *Biofouling*, v. 26, p. 567-575, 2010.
- SILLANKORVA, S.; PLETENEVA, E.; SHABUROVA, O.; SANTOS, S.; CARVALHO, C.; AZEREDO, J.; *Salmonella Enteritidis* bacteriophage candidates for phage therapy of poultry. *Journal of Applied Microbiology*, v.108, p.1175–86, 2010.
- SILVA, Y. J.; COSTA, L.; PEREIRA, C, *et al.* Influence of environmental variables in the efficiency of phage therapy in aquaculture. *Microbial Biotechnology*, v. 7(5), p.401-413, 2014.
- SIME-NGANDO, T. Environmental bacteriophages: viruses of microbes in aquatic ecosystems. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, a. 355, p. 1-14, 2014.
- SKURNIK, M.; STRAUCH, E. Phage therapy: facts and fiction. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 296, p. 5-14, 2006.
- SMITH, H. W.; HUGGINS, M. B. Successful Treatment of Experimental *Escherichia coli* Infections in Mice Using Phage:

its General Superiority over Antibiotics. Journal of general microbiology, v. 128(2), p.307-18, 1982.

SODDELL, J. A.; FOAMING, I. N.; SEVIOUR, R. J.; BLACKALL, L. L. The microbiology of activated sludge. Boston7 Kluwer, p. 161– 202, 1999.

SONENSHEIN, A. L. Trapping of unreplicated phage DNA into spores of *Bacillus subtilis* and its stabilization against damage by 32P decay. Virology, v. 42, n. 2, p. 488-495, 1970.

SONENSHEIN, A.L. Bacteriophages: How Bacterial Spores Capture and Protect Phage DNA. Current Biology: Dispatches, v.16: 14-16, 2005.

SONENSHEIN, A.L.; ROSCOE D.H. The Course of Phage 4e Infection in Sporulating Cells of *Bacillus subtilis* Strain 3610. Virology, v. 39, p. 265-276, 1969.

STEPHEN, T.A.; CAMERON, A.T. Phage therapy pharmacology. Current Pharmaceutical Biotechnology, v. 11(1), p. 28-47, 2010.

SUYAMA, M.; TORRENTS, D.; BORK, P. PAL2NAL: robust conversion of protein sequence alignments into the corresponding codon alignments. Nucleic Acids Research 34(Web Server issue):W609-W612, 2006.

STAMATAKIS, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics, v. 30, n. 9, p.1312-1313, 2014.

STRAUCH, M. A.; HOCH, J. A. Signal transduction in *Bacillus subtilis* sporulation. Current Opinion in Genetics & Development, v. 3, n. 2, p. 203-212, 1993.

SULAKVELIDZE, A.; ALAVIDZE, Z.; MORRIS J.G. Bacteriophage therapy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.45, p. 649-659, 2001.

SUMMER, E.J.; LIU, M.; SUMMER, N.S.; GILL, J.J.; JANES, C. YOUNG, R. Phage of Sulfate Reducing Bacteria Isolated From High Saline Environment. NACE Internacional, 2011.

- STEPHENSON, R. J.; BRANION, R. M. R.; PINDER, K. L. Anaerobic 35 8C and 55 8C treatment of a BCTMP/TMP effluent: Sulphur management strategies. *Water Science and Technology*, v.29, p. 433– 445, 1995.
- STRUCHTEMEYER, C. G.; DAVIS, J. P.; ELSHAHED, M. S. Influence of the drilling mud formulation process on the bacterial communities in thermogenic natural gas wells of the Barnett Shale. *Applied Environ Microbiology*, v. 77, n. 14, p. 4744-4753, 2011.
- SULAKVELIDZE, A.; ALAVIDZE, Z.; MORRIS, J. G. Bacteriophage therapy, *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 45, p. 649-659, 2001.
- SURETTE, M. D.; WRIGHT, G. D. Lessons from the environmental antibiotic resistome. *Annual Review of Microbiology*, v. 71, p. 309-329, 2017.
- SUTTLE, C. A.; CHEN, F. Mechanisms and Rates of Decay of Marine Viruses in Seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 58, n. 11, p. 3721-3729, 1992.
- TAKAHASHI, I. Incorporation of bacteriophage genome by spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, v. 87, p. 1499-1502, 1964.
- TAKAHASHI, I. Genetic transduction in *Bacillus subtilis*. *Biochemistry and Biophysics Research.*, v.5, p.171-175, 1961.
- TANG, K.; BASKARAN, V.; NEMATI, M. Bacteria of the sulphur cycle: an overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. *Biochem Eng J.*, v.44, p. 73–94, 2009.
- TANJI Y, SHIMADA T, YOICHI M, MIYANAGA K, HORI K, UNNO H. Toward rational control of *Escherichia coli* O157:H7 by a phage cocktail. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 64, p. 270-274, 2004.
- TAVARES, M. B.; SOUZA, RENATA D. L., WILSON B.; CAVALCANTE, R. C. M.; CASAROLI, C.; MARTINS, E. G.; FERREIRA, R. C. C.; FERREIRA, L. *Bacillus subtilis* Endospores at High Purity and Recovery Yields: Optimization

of Growth Conditions and Purification Method. *Current Microbiology*, v. 68, p. 279-285, 2013.

UHL, M. A.; MILLER, J. F. Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the *Bordetella pertussis* BVgAS phosphorelay. *EMBO Journal*, v. 15, p. 1028–1036, 1996.

VIKESLAND, P. J.; PRUDEN A.; ALVAREZ, P. J. J.; AGA, D.; BÜRGMANN, H.; LI, X-D.; MANAIA, C. M.; NAMBI, I.; WIGGINTON, K.; ZHANG, T.; ZHU, Y-G Toward a Comprehensive Strategy to Mitigate Dissemination of Environmental Sources of Antibiotic Resistance. *Environmental Science & Technology*, v. 51, n. 22, p. 13061-13069, 2017.

VIERTEL, T. M.; RITTER, K.; HORZ, H.-P. Viruses versus bacteria—novel approaches to phage therapy as a tool against multidrug-resistant pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 69, n. 9, p. 2326-2336, 2014.

VINCENT, C.; BOERLIN, P.; DAIGNAULT D, DOZOIS CM, DUTIL L, GALANAKIS C, et al. Food Reservoir for *Escherichia coli* Causing Urinary Tract Infections. *Emerg Infect Dis.*, v. 16(1), p.88-95, 2010.

VOLK, H.; HENDRY P., 3^o Oil Recovery: Fundamental Approaches and Principles of Microbially Enhanced Oil Recovery, *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, K.N. Timmis, p. 2728-2736, 2010.

VOSS, B. J.; GADDY, J. A.; MCDONALD, W. H.; COVER, T. L. Analysis of surface-exposed outer membrane proteins in *Helicobacter pylori*. *Journal of bacteriology*, v. 196, n. 13, p. 2455-2471, 2014.

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

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

- ZHAN, Y.; BUCHAN, A.; CHEN, F. Novel N4 Bacteriophages Prevail in the Cold Biosphere. Applied and Environmental Microbiology, v. 81, p. 5196-5202, 2015.
- WAGEMANS, J.; BLASDEL, B. G.; VAN DEN BOSSCHE, A.; UYTTERHOEVEN, B.; DE SMET, J.; PAESHUYSE, J.; CENENS, W.; AERTSEN, A.; UETZ, P.; DELATTRE, A-S.; CEYSSSENS, P-J.; LAVIGNE, R. Functional elucidation of antibacterial phage ORFans targeting *Pseudomonas aeruginosa*. Cellular Microbiology, v. 16, n. 12, p. 1822-1835, 2014.
- WALSHE, G. E.; PANG, L.; FLURY, M.; CLOSE, M. E.; FLINTOFT, M. Effects of pH, ionic strength, dissolved organic matter, and flow rate on the co-transport of MS2 bacteriophages with kaolinite in gravel aquifer media. Water Research, v. 44, p. 1255-1269, 2010.
- WANG, I. N. Lysis timing and bacteriophage fitness. Genetics, v.172, p.17–26, 2010.
- WINGET, D. M.; WOMMACK, K. E. Randomly Amplified Polymorphic DNA PCR as a tool for Assessment of Marine Viral Richness. Applied and Environmental Microbiology, v. 74(9), p. 2612-2618, 2008.
- WEINBAUER, M. G. Ecology of prokaryotic viruses. FEMS Microbiology Reviews, v. 28, p. 127-181, 2004.
- WOMMACK, K. E.; COLWELL, R. R. Virioplankton, pp. viruses in aquatic ecosystems. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 64, p. 69–114, 2000.
- WOOLHOUSE, M. E.; WEBSTER J. P.; DOMINGO, E.; CHARLESWORTH, B. L.; BRUCE, R. Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts. Nature Genetics, v. 32, p. 569-577, 2002.
- YACOBY, I.; BAR, H.; BENHAR, I. Targeted drug bacteriophages as antibacterial Nanomedicines. Antimicrobial Agents Chemotherapy, p.2156-2163, 2007.
- YASUDA, Y.; TOCHIKUBO, K. Relation between D-glucose and L- and D-alanine in the initiation of germination of *Bacillus*

subtilis spore. Microbiology and Immunology, v. 28, n. 2, p. 197-207, 1984.

- YEHLE, C.O.; DOI, R.H. Differential expression of bacteriophage genomes in vegetative and sporulating cells of *Bacillus subtilis*. Journal of Virology, v.1 (5), p. 935-947, 1967.
- YOSEF, I.; MANOR, M.; KIRO, R.; QIMRON, U. Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria. Proceedings of National Academy of Science USA, v. 112, n. 23, p. 7267-7272, 2015.
- YOUNG, R. GILL, J.J. Phage therapy redux – What is to be done? Science, v. 350, p. 1163-1164, 2015.
- YU, P.; MATHIEU, J.; LI, M.; DAI, Z.; ALVAREZ, P. J. Isolation of Polyvalent Bacteriophages by Sequential Multiple-Host Approaches. Applied and Environmental Microbiology, v. 82(3), p. 808-815. 2016.
- YU, P.; MATHIEU, J.; LU, G. W.; GABIATTI, N.; ALVAREZ, P. J. Control of antibiotic-resistant bacteria in activated sludge using polyvalent phages in conjunction with a production host. Environmental Science and Technology Letters, v. 4, n. 4, p. 137-142, 2017a.
- YU, P.; MATHIEU, J.; YANG, Y.; ALVAREZ, P. J. J. Suppression of enteric bacteria by bacteriophages: Importance of phage polyvalence in the presence of soil bacteria. Environmental Science and Technology, v. 51, n. 9, p. 5270-5278, 2017b.
- YUE, J.-X.; LI, J.; AIGRAIN, L.; HALLIN, J.; PERSSON, K.; OLIVER, K.; BERGSTRÖM, A.; COUPLAND, P.; WARRINGER, J.; LAGOMARSINO, M.C.; FISCHER, G.; DURBIN, R.; LITI, G. Contrasting evolutionary genome dynamics between domesticated and wild yeasts. Nature Genetics, v. 49, p. 913, 2017.

7. ANEXOS

Figura A1 Cinética de adsorção do fago ϕ NA01 em cada hospedeiro de isolamento. P_0 é o número de fagos livres no tempo 0, e P_t é o número de fagos livres no tempo t . *Trendline* é a linha de regressão linear. Barras de erro indicam desvios padrão da média de experimentos independentes em triplicata.

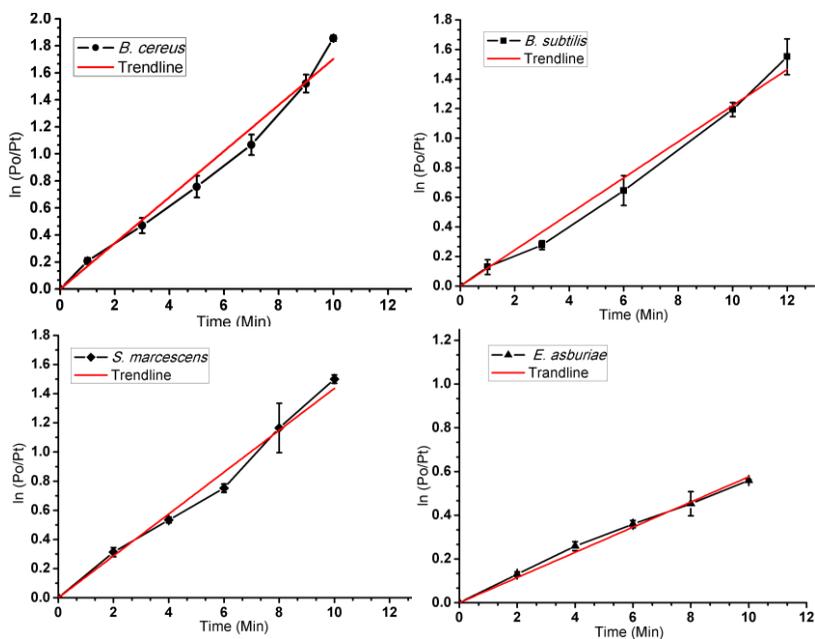


Figura A2 Cinética de adsorção do fago ϕ NA03 em cada hospedeiro de isolamento. P_0 é o número de fagos livres no tempo 0, e P_t é o número de fagos livres no tempo t . *Trendline* é a linha de regressão linear. Barras de erro indicam desvios padrão da média de experimentos independentes em triplicata.

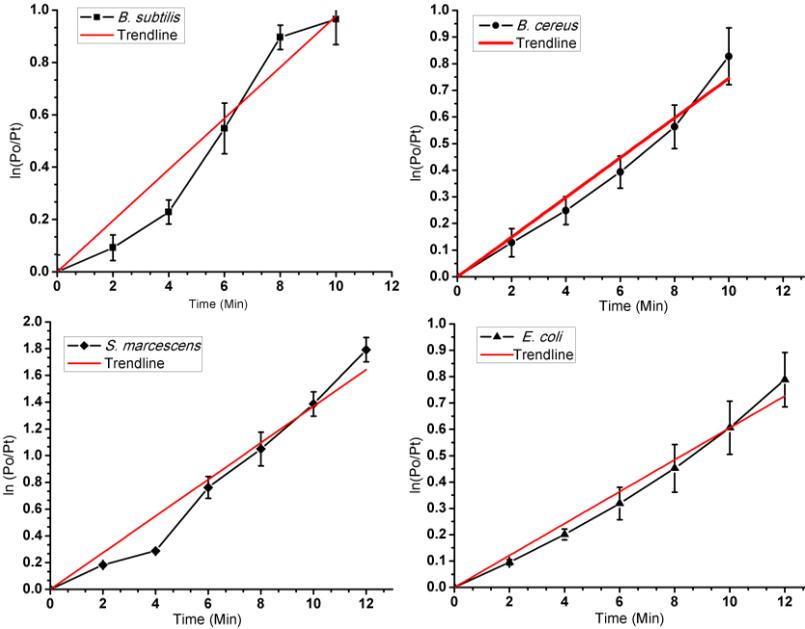


Tabela A1 Lista dos 34 fagos do gênero N4 utilizados na análise filogenética e matriz de verossimilhança para comparação evolutiva com o fago ϕ NA01.

Fago	Hospedeiro	Genoma (Kbp)	N. acesso Genbank
N4	<i>Escherichia coli</i> K12	70.2	EF056009
DSS3F2	<i>Ruegeria pomeroyi</i> DSS-3	74.6	FJ591093
EE36F1	<i>Sulfitobacter</i> sp. EE-36	73.3	FJ591094
LIT1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> US449	72.5	NC_013692
LUZ7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Br257	74.9	NC_013691
PEV2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAV237	72.7	NC_031063
S6	<i>Erwinia amylovora</i>	74.7	HQ728266
ECPB1	<i>Escherichia coli</i> KBP21	69.9	JX415535
PA26	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	72.3	JX194238
G7C	<i>Escherichia coli</i> cepa 4s	71.8	HQ259105
IME11	<i>Escherichia coli</i>	72.6	JX880034
EC1-UPM	<i>Escherichia coli</i> O78:K80	70.9	KC206276
FSL SP-058	<i>Salmonella serova Dublin</i>	72.0	KC139517
FSL SP-076	<i>Salmonella serova Dublin</i>	72.0	KC139520
JA1	<i>Vibriocholerae</i> O139	69.3	KC438282
Presley	<i>Acinetobacter baumannii</i> M2	77.2	KF669658
VCO139	<i>Vibrio cholerae</i> O139 Bengal	68.9	KC438283
JW Alpha	<i>Achromobacter xylooxidans</i> DSM 11852	72.3	KF787095
JW Delta	<i>Achromobacter xylooxidans</i> DSM 11852	73.7	KF787094
pCB2047-B	<i>Sulfitobacter</i> sp. cepa 2047	74.5	HQ317387
EcP1	<i>Escherichia coli</i> 285	59.1	HQ641380
pYD6-A	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. YD6	76.8	NC_020849

VBP32	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD2210633	76.7	HQ634196
VCP47	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD2210633	76.7	HQ634194
RLP1	<i>Roseovarius</i> sp. 217	74.6	FR682616
RPP1	<i>Roseovarius nubinhibens</i>	74.7	FR719956
DFL12phi1	<i>Dinoroseobacter shibae</i> DFL12	75.0	KJ1621082
vBshPR2C	<i>Dinoroseobacter shibae</i> DFL12	74.8	KJ803031
DS-1410Ws-06	<i>Dinoroseobacter shibae</i> DFL12	76.5	KU885988
RD-1410W1-01	<i>Rhodanobacter denitrificans</i> OCh114	72.7	KU885989
RD-1410Ws-07	<i>Rhodanobacter denitrificans</i> OCh114	76.3	KU885990
vB_EcoPBp4	<i>Escherichia coli</i>	72.5	KJ155004.2
KPP21	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	73.4	LC064302

Tabela A2 Todas as ORFs anotadas para o fago ϕ NA01 indicando o início e o fim da sequência de cada uma e incluindo o módulo funcional atribuído àquelas anotadas funcionalmente.

ORF	Início	Fim	Função	Módulo funcional
ORF 1	6	1268	Proteína da cauda do fago	Morfogênese viral
ORF 2	1312	1800	Lisina do fago (EC 3.2.1.17)	Lise
ORF 3	1797	2018	Proteína hipotética	
ORF 4	1999	2508	Endopeptidase do fago (EC 3.4.-.-)	Lise
ORF 5	2585	3028	Proteína da cauda do fago	Morfogênese viral
ORF 6	3256	3071	Proteína hipotética	
ORF 7	3483	3253	Proteína hipotética	
ORF 8	4286	3480	Adenina metilase do DNA (EC 2.1.1.72)	Metabolismo DNA
ORF 9	4399	4283	Proteína hipotética	
ORF 10	4765	4442	Proteína hipotética	
ORF 11	5185	4811	Proteína hipotética	
ORF 12	5679	5179	Proteína hipotética	
ORF 13	8296	5672	DNA polimerase I (EC 2.7.7.7)	Replicação DNA
ORF 14	10187	8349	Proteína inibidora de lise rIIB do fago	Inibição de lise
ORF 15	12673	10196	Proteína inibidora de lise rIIA do fago	Inibição de lise
ORF 16	12920	12744	Proteína hipotética	
ORF 17	13099	12920	Proteína hipotética	
ORF 18	13424	13056	Proteína hipotética	
ORF 19	13789	13424	Proteína PhAPEC5_32	Proteína viral
ORF 20	14253	13786	Proteína hipotética	
ORF 21	15701	14304	DNA helicase do tipo RecD	Replicação DNA

ORF 22	16907	15726	N4 gp25-like Proteína	Proteína viral
ORF 23	17969	16917	Proteína de ligação ATP/GTP putativa	Metabolismo DNA
ORF 24	18210	17971	Proteína hipotética	
ORF 25	18891	18220	Proteína hipotética	
ORF 26	19797	18961	Serina protease	Morfogênese viral
ORF 27	19993	19790	Proteína hipotética	
ORF 28	20315	19986	Proteína hipotética	
ORF 29	20677	20312	HNH homing endonuclease	Metabolismo DNA
ORF 30	20828	20640	Proteína hipotética	
ORF 31	21354	20812	Proteína hipotética	
ORF 32	21521	21351	Proteína hipotética	
ORF 33	22204	21542	Proteína do core, homóloga a gp14 do fago N4	Morfogênese viral
ORF 34	22340	22179	Proteína hipotética	
ORF 35	22581	22333	Proteína hipotética	
ORF 36	23417	23133	Proteína hipotética	
ORF 37	23852	23469	Proteína hipotética	
ORF 38	24106	23858	Proteína hipotética	
ORF 39	24318	24097	Proteína hipotética	
ORF 40	24498	24364	Proteína hipotética	
ORF 41	25759	24485	Subunidade maior da RNA polimerase	Transcrição
ORF 42	25976	25749	Proteína hipotética	
ORF 43	27001	25994	RNA polimerase, fago-associada	Transcrição
ORF 44	27279	27001	Proteína hipotética	

ORF 45	27581	27276	Proteína hipotética
ORF 46	27918	27628	Proteína hipotética
ORF 47	28261	28001	Proteína hipotética
ORF 48	28551	28258	Proteína hipotética
ORF 49	28792	28538	Proteína hipotética
ORF 50	28922	28794	Proteína hipotética
ORF 51	29197	28919	Proteína hipotética
ORF 52	29538	29200	Proteína hipotética
ORF 53	30002	29811	Proteína hipotética
ORF 54	30198	29959	Proteína hipotética
ORF 55	30388	30185	Proteína hipotética
ORF 56	30940	30668	Proteína hipotética
ORF 57	31119	30943	Proteína hipotética
ORF 58	31425	31135	Proteína hipotética
ORF 59	31637	31428	Proteína hipotética
ORF 60	31791	31648	Proteína hipotética
ORF 61	32037	31828	Proteína hipotética
ORF 62	32938	32702	Proteína hipotética
ORF 63	33230	33424	Proteína hipotética
ORF 64	33680	34375	Proteína homóloga a gp69 do fago N4
ORF 65	34477	36081	Subunidade maior da terminase
ORF 66	36091	36972	Proteína hipotética
ORF 67	37421	37002	Proteína hipotética
ORF 68	37729	37418	Proteína associada à fago
			Proteína viral
			Empacot. DNA

ORF 69	39393	38773	Proteína hipotética	
ORF 70	39450	41711	Proteína portal	Morfogênese viral
ORF 71	41781	42095	Proteína hipotética	
ORF 72	42099	43259	Proteína <i>tape measure</i>	Morfogênese viral
ORF 73	43274	44446	Proteína da família do capsídeo - gp56 do N4	Morfogênese viral
ORF 74	44530	45072	Proteína homóloga a gp55 do fago N4	Proteína viral
ORF 75	45082	46311	Proteína homóloga a gp54 do fago N4	Proteína viral
ORF 76	46368	49082	Proteína homóloga a gp53 do fago N4	Proteína viral
ORF 77	49091	49525	Proteína hipotética	
ORF 78	49529	50590	Proteína hipotética	
ORF 79	50632	61272	vRNA polymerase	Transcrição
ORF 80	61481	61308	Proteína hipotética	
ORF 81	62172	61492	Proteína hipotética	
ORF 82	62738	62175	Proteína hipotética	
ORF 83	63024	62701	Proteína hipotética	
ORF 84	63807	63067	Proteína de ligação ssDNA	Replicação DNA
ORF 85	64339	63809	<i>Homing</i> endonuclease (HE), associada a fagos	Metabolismo DNA
ORF 86	65067	64336	Proteína homóloga a gp44 do fago N4	Proteína viral
ORF 87	67296	65137	DNA primase associada a fagos	Replicação DNA
ORF 88	68279	67305	Proteína hipotética	
ORF 89	68736	68257	Proteína PD-(D/E)XK da família das nucleases	Metabolismo DNA

ORF 90	70524	68794	Ribonucleotideo reductase, classe Ia, subunidade alfa (EC 1.17.4.1)	Metabolismo DNA
ORF 91	71591	70527	Ribonucleotideo reductase, classe Ia, subunidade beta (EC 1.17.4.1)	Metabolismo DNA
ORF 92	72430	71678	Timidilato sintase thyX (EC 2.1.1.-)	Metabolismo DNA
ORF 93	72513	73232	Proteína hipotética	

Tabela A3 Sequências referentes ao RNA transportador encontradas no genoma do fago ϕ NA01.

tRNA #	Início	Fim	Tipo	Códon
1	38396	38322	Asn	AAC
2	38316	38242	Asp	GAC
3	38234	38158	Pro	CCA
4	38151	38062	Ser	TCA
5	37988	37912	Gln	CAA