

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
CURSO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RAPHAEL DA SILVA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTERÍOFAGOS DA PECUÁRIA
BRASILEIRA - ÊNFASE EM SANTA CATARINA**

FLORIANÓPOLIS

2022

RAPHAEL DA SILVA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTERÍOFAGOS DA PECUÁRIA
BRASILEIRA - ÊNFASE EM SANTA CATARINA**

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a Gislaine Fongaro, Dr^a.

FLORIANÓPOLIS

2022

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

Silva, Raphael
ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTERÍOFAGOS DA PECUÁRIA
BRASILEIRA - ÊNFASE EM SANTA CATARINA / Raphael Silva ;
orientador, Gislaine Fongaro, 2022.
59 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis,
2022.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Saúde única. 3. Genômica. 4.
Fagos. 5. Enterobacteriaceae. I. Fongaro, Gislaine. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Ciências Biológicas. III. Título.

Raphael da Silva

**Isolamento e caracterização de bacteriófagos da pecuária
brasileira - ênfase em Santa Catarina**

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de licenciado e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação em Ciências Biológicas.

Florianópolis, 10 de Março de 2022.

Prof. Daniela Cristina de Toni, Dr.^a
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Gislaine Fongaro, Dr.^a
Orientador(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Aline Viancelli, Dr.^a
Avaliadora
Universidade do Contestado

Prof.^o Glauber Wagner, Dr.^o
Avaliador
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado a todos que de alguma forma me ajudaram a torná-lo possível.

AGRADECIMENTOS

Assim como tudo na ciência, a realização deste trabalho só foi possível graças ao auxílio de diversas pessoas, então, deixo aqui o meu agradecimento a todos os meus colegas do Laboratório de Virologia Aplicada, de alguma forma todos tem sua parte neste trabalho.

Ao Vilmar do Laboratório de Bioinformática que foi outro colega que me deu um enorme suporte na produção deste trabalho, todas as análises dos dados produzidos pelo sequenciamento só foram possíveis graças à força que ele nos deu, por isso agradeço muito pela sua ajuda.

Deixo também um agradecimento especial a prof^a Gislaine pela paciência, por todo auxílio, pelas oportunidades e ensinamentos ao longo deste período acadêmico. Fico feliz e grato de ter feito parte desta nova era do LVA.

Por fim, agradeço a minha companheira, Danka, que esteve ao meu lado durante esse árduo período acadêmico que se estendeu mais do que o esperado, espero que a minha companhia nesse período tenha sido tão importante para você, quanto você foi para mim. Os sacrifícios não serão em vão.

“(…) Todo amanhã se cria num ontem, através de um hoje. De modo que nosso futuro baseia-se num passado e se corporifica num presente. Temos que saber o que fomos e o que somos, para saber o que seremos” (FREIRE, 1979).

RESUMO

A pecuária é uma atividade extremamente relevante economicamente no Brasil e para o mundo, sendo que o país encontra-se entre os principais produtores e exportadores mundiais de carne. Recentemente, observa-se um aumento no número de casos de surtos de doenças transmitidas por alimentos, sendo que entre os principais agentes etiológicos estão as bactérias da família *Enterobacteriaceae*, caracterizadas por serem Gram-negativas, não formadoras de esporos, anaeróbios facultativos, fermentadores de lactose e presentes no intestino de mamíferos. Devido ao frequente surgimento de novas cepas bacterianas com resistência aos antibióticos, se torna necessário o desenvolvimento de novas alternativas para o controle desses micro-organismos. Os bacteriófagos são vírus de procariotos, capazes de interagir no ciclo replicativo bacteriano, no seu controle e também na resistência microbiana. O seu conhecimento data do início do século XX, porém com o desenvolvimento dos antibióticos estudos usando fagos para controle sanitário ficaram em segundo plano, sendo estimado que apenas 0,0002% da diversidade global de bacteriófagos foi amostrada e estudada. Uma alternativa ao uso dos antibióticos são os coquetéis bacteriofágicos, os quais devem conter diversas espécies de bacteriófagos com capacidade lítica, podendo ou não possuir um amplo espectro infeccioso contra as bactérias. Este trabalho teve como objetivo buscar por bacteriófagos presentes em dejetos da pecuária brasileira, coletados em fazendas e granjas do Oeste do estado de Santa Catarina, que possuam capacidade lítica, compondo assim um biobanco, como possíveis alternativas contra enterobactérias de interesse no âmbito da saúde pública, que possa ser uma alternativa para aplicação na agroindústria, prezando pela saúde única (animal, humana e ambiental). Para isso, foram analisadas diferentes amostras de dejetos de granjas produtoras de aves, suínos e bovinos. Foi utilizado o método de duplo ágar para o isolamento dos bacteriófagos e o título viral foi determinado pelo cálculo de Unidades Formadoras de Placa, uma análise inicial para caracterização morfológica foi realizada por meio de microscopia eletrônica. Os isolados, devidamente filtrados e eluídos, foram avaliados molecularmente por sequenciamento de nova geração. As sequências foram avaliadas, sendo os genomas montados e analisados usando o programa *Genome Detective*. A predição e anotação gênica foi realizada com o *software* Prokka. A busca por genes de resistência foi realizada usando o programa CARD RGI. Resultados apontaram para o isolamento de 5 fagos com capacidade lítica em enterobactérias, sendo 3 com capacidade de infectar *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, 1 *Enterobacter aerogenes* e 1 *Klebsiella pneumoniae*. Os dados obtidos através das montagens e predições dos genomas indicam que os fagos pertencem às famílias *Siphoviridae* e *Myoviridae*, sendo destaque o isolado KPSM1 (hospedeira *K. pneumoniae*) que apresentou 10 diferentes possíveis genes responsáveis pela resistência a diferentes classes de antibióticos. Esses dados demonstram a necessidade de explorar amostras provenientes da pecuária, a fim de buscar por bacteriófagos tanto para fins de biocontrole bacteriano, quanto para fins de estudos de resistências bacterianas mediadas por esses vírus, especialmente em bactérias com caráter zoonótico e ambiental.

Palavras chave: Saúde única; Genômica; Fagos; *Enterobacteriaceae*.

ABSTRACT

Livestock is an extremely economically relevant area in Brazil and the world, the country is among the main producers and exporters of meat in the world. Recently, an increase in the number of cases of foodborne diseases has been observed, among the main etiological agents are the bacteria of the *Enterobacteriaceae* family, characterized by being Gram-negative, non-spore forming, facultative anaerobes, lactose fermenters and present in the intestine of mammals. Due to the frequent emergence of new antibiotic resistant bacterial strains, it is necessary to develop new alternatives to combat these microorganisms. Bacteriophages are prokaryotic viruses, capable of interacting with the bacterial replicative cycle, in its control and also in microbial resistance. Their knowledge dates back to the beginning of the 20th century, however, with the development of antibiotics, studies using phages for sanitary control were in the background, being estimated that only 0.0002% of the global diversity of bacteriophages was sampled and studied. An alternative to the use of antibiotics are bacteriophage cocktails, which must contain several species of bacteriophages with lytic capacity, which may or may not have a broad spectrum of infection against bacteria. This work aimed to search for bacteriophages present in Brazilian livestock waste, collected on farms in the West of the state of Santa Catarina, which have lytic capacity, thus composing a biobank, as possible alternatives against enterobacteria of interest in the scope of public health, which can be an alternative for application in the agroindustry, valuing the One-health approach (animal, human and environmental health). For this, different samples of manure from poultry, swine and cattle farms were analyzed. The double agar method was used for the isolation of bacteriophages and the viral titer was determined by the calculation of Plaque Forming Units, an initial analysis for morphological characterization was performed using electron microscopy. The isolates, properly filtered and eluted, were molecularly evaluated by next-generation sequencing. The sequences were evaluated, and the genomes were assembled and analyzed using the Genome Detective software. The prediction and gene annotation was performed with the Prokka. The search for resistance genes was performed using the CARD RGI software. Results pointed to the isolation of 5 phages with lytic capacity for enterobacterias, 3 with the capacity to infect *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, 1 *Enterobacter aerogenes* and 1 *Klebsiella pneumoniae*. The data obtained through the assembly and predictions of the genomes indicate that the phages belong to the *Siphoviridae* and *Myoviridae* families, with emphasis on the isolate KPSM1 (host *K. pneumoniae*) that presented 10 different possibilities of genes responsible for resistance to different classes of antibiotics. These data demonstrate the need to explore livestock waste samples, in order to search for phages both for bacterial biocontrol purposes and for the purposes of phage-mediated bacterial resistance studies, especially in bacteria with zoonotic and environmental characteristics.

Keywords: One-health; Genomics; Phages; *Enterobacteriaceae*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Comparação das principais famílias da ordem *Caudovirales*;

Figura 2 - Os ciclos replicativos dos fagos;

Figura 3 - Formação de UFPs em *S. enterica* sorotipo Typhimurium;

Figura 4 - Placas de lise formadas pelo isolado *Salmonella enterica* Phage SECF1;

Figura 5 - Imagem gerada por microscopia eletrônica do isolado SM1.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Título viral e quantidade de material genético enviado para SNG;

Tabela 2 - Resultados do sequenciamento;

Tabela 3 - Identificação taxonômica a partir da montagem dos isolados via *Genome Detective*.

Tabela 4 - Classificação funcional das proteínas produzidas pelos genes do fago SM1;

Tabela 5 - Classificação funcional das proteínas produzidas pelos genes do fago SECF1;

Tabela 6 - Classificação funcional das proteínas produzidas pelos genes do fago SEPL1;

Tabela 7 - Classificação funcional das proteínas produzidas pelos genes do fago EASM1;

Tabela 8 - Classificação funcional das proteínas produzidas pelos genes do fago KPSM1;

Tabela 9 - Genes de resistência encontrados na análise por CARD RGI.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARO Antibiotic Resistance Ontology
ATCC American Type Culture Collection
BHI Brain Heart Infusion
Bp Base Pair
CARD Comprehensive Antibiotic Resistance Database
dfDNA Ácido desoxirribonucleico de dupla fita
DO Densidade Óptica
kV Quilovolt
kb Quilobase
mM milimolar
mL mililitro
NCTC National Collection of Type Cultures
NP Número de Placas
nM Nanômetro
PBS Phosphate Buffered Saline
Ph Potencial Hidrogeniônico
RBPs Proteínas Ligantes de Receptores
RCF Relative Centrifugal Force
RD Recíproca da Diluição
RGI Resistance Genes Identifier
RPM Rotações Por Minuto
RNA Ácido Ribonucleico
SM Sodium chloride Magnesium sulphate
SNG Sequenciamento de Nova Geração
Spp Espécies
TEM Microscopia Eletrônica de Transmissão
UFP Unidades Formadoras de Placas
UV Ultra Violeta
V Volume
WDCM World Data Centre for Microorganisms
xg vezes a gravidade
 μ M micrômetro
U/ μ L Unidades por microlitro

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Contagem de placas de lise.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	CONTEXTO EPIDEMIOLÓGICO	15
1.2	ENTEROBACTÉRIAS	15
1.3	BACTERIÓFAGOS	16
1.4	OBJETIVOS	24
1.4.1	Objetivo Geral	24
1.4.2	Objetivos Específicos	24
2	MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1	AMOSTRAS DE DEJETOS DA PECUÁRIA CATARINENSE	25
2.2	BACTÉRIAS HOSPEDEIRAS	25
2.3	INFECÇÃO BACTERIOFÁGICA <i>IN VITRO</i>	25
2.4	ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS FAGOS	25
2.5	TITULAÇÃO DOS FAGOS E DETERMINAÇÃO DA VIRULÊNCIA	26
2.6	CARACTERIZAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA	27
2.7	EXTRAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO E SEQUENCIAMENTO GENÔMICO	27
2.9	MONTAGEM E ANÁLISE DOS GENOMAS VIRAIS	28
2.10	BUSCA POR GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS NO GENOMA DOS FAGOS	28
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
3.1	ISOLAMENTO VIRAL	29
3.2	MICROSCOPIA ELETRÔNICA	30
3.3	TÍTULO VIRAL, EXTRAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO E SEQUENCIAMENTO	32
3.4	MONTAGEM E ANÁLISES DOS GENOMAS	32
3.5	BUSCA POR GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS NO GENOMA DOS FAGOS	44
4	CONCLUSÃO	48
5	REFERÊNCIAS	49
6	APENDICE	56
6.1	PRODUÇÕES ACADÊMICAS E PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS	56

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTO EPIDEMIOLÓGICO

De acordo com dados disponibilizados em 2019 pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, o Brasil se encontra entre os principais produtores e exportadores de carne (bois, porcos e aves), setor esse que vem crescendo ano após ano para o país (USDA, 2019).

Surtos causados por patógenos contaminantes de corpos d'água e alimentos ocorrem anualmente, dados publicados em 2022 pela Secretaria de Vigilância em Saúde mostram que, dentre os principais agentes etiológicos causadores de surtos de doenças transmitidas por alimentos, diferentes espécies de enterobactérias são encontradas, sendo que *Salmonella* e *Escherichia coli* (*E. coli*) se encontram dentre os principais contaminantes destes alimentos e corpos d'água (SVS - MS, 2022).

A contaminação dos alimentos pode ocorrer em qualquer uma das etapas da produção, plantio, manuseio, transporte, cozimento, acondicionamento, entre outros. Alimentos de origem animal estão entre os que mais causam esses surtos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Superfícies úmidas provêm um substrato propício ao desenvolvimento de biofilmes persistentes, os quais podem conter microrganismos patogênicos, sendo que grande parte pode ser transmitidos por alimentos e formar biofilmes nas áreas de produção industrial (BRIDIER *et al.*, 2015).

O amplo uso de antibióticos na pecuária para tratamento e prevenção de doenças, resulta na emissão ao ambiente destes agentes químicos através do dejetos dos animais tratados, estes dejetos podem servir então como reservatórios para genes de resistência além de propiciar a seleção de bactérias resistentes a tais antibióticos no ambiente (CALERO-CÁCERES, YE, BALCÁZAR, 2019). Drogas da classe dos β -lactâmicos já foram observadas em amostras de fezes de porcos, bois e aves, além dos solos de fazendas de criação de animais (LARRAÑAGA *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2018). A partir de amostras de dejetos suínos também já se recuperou antibióticos das classes: macrolídeos, fenicóis, quilonona, sulfonamidas e tetraciclina (WANG *et al.*, 2018).

1.2 ENTEROBACTÉRIAS

As enterobactérias são bactérias em forma de bastão, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, Gram-negativas, não formadoras de esporos, anaeróbios facultativos,

fermentadores de lactose e estão presentes no intestino de mamíferos (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1997).

Várias enterobactérias são colonizadoras que mantêm uma relação de simbiose com seus hospedeiros, porém, existem diversas espécies ou sorotipos que são causadoras de doenças. A *Salmonella enterica* subespécie enterica sorotipo Typhimurium, por exemplo, é o agente causador de salmonelose não tifóide em humanos (THUNG *et al.*, 2019). Diferentes sorotipos de *E. coli* (e.g. Enteropatogênicas [EPEC], Enterotoxigênicas [ETEC] e sorotipo O157:H7 enterohemorrágica) podem causar graves doenças entéricas, sendo de grande problemática principalmente em países em desenvolvimento (GUENTZEL, 1996).

Dentre outras enterobactérias de importância em saúde pública pode-se destacar *Enterobacter aerogenes* (*E. aerogenes*) procarioto da família *Enterobacteriaceae*, o qual também é um patógeno oportunista para humanos, causando infecções, especialmente em ambientes hospitalares. *E. aerogenes* apresenta diversas cepas resistentes a antibióticos, alguns dos mecanismos envolvidos nessa vantagem sobre tais antimicrobianos químicos envolvem, a aquisição de elementos genéticos móveis que conferem resistência a diversas classes de antibióticos, como os amplamente usados carbapenêmicos e β -lactâmicos, através de mecanismos clássicos como a utilização de bombas de efluxo de moléculas de antibióticos (DAVIN-REGLI & PAGÈS, 2015).

Além de *E. aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) é também uma bactéria Gram-negativa da família *Enterobacteriaceae*, patógeno nosocomial de grande relevância que pode causar infecções em humanos levando a quadros de pneumonia, bronquite e inflamação no trato urinário (DONG *et al.*, 2015). *K. pneumoniae* também apresenta diversas cepas multirresistentes a antibióticos, se tornando dessa forma outro patógeno de importância para a saúde pública, tendo sido já identificado no Brasil, em amostras de pacientes não hospitalizados (AZEVEDO *et al.*, 2019).

Na pecuária, o mal uso de antibióticos em animais de corte tem contribuído para a seleção de bactérias multirresistentes, tendo isso em vista se faz necessária a busca por métodos alternativos ao uso de antibióticos (VIGRE *et al.*, 2008; BOYEN *et al.*, 2008). A resistência de enterobactérias como *E. coli*, e outras bactéria como citado acima, aos carbapenêmicos, por exemplo, já vem sendo observada há certo tempo, e é possível que

epidemias causadas por microrganismos produtores de carbapenases estejam por ocorrer (TSUTSUI *et al.*, 2019).

1.3 BACTERIÓFAGOS

Os bacteriófagos, ou apenas fagos, são vírus de procariotos, seres ubíquos e possivelmente o grupo mais diverso, abundante e antigo de vírus (ACKERMANN, 2007). Eles são encontrados nos ambientes em que seus hospedeiros se encontram, estima-se que existam 10^{31} partículas de fagos no planeta, ultrapassando em dez vezes o número de células bacterianas em determinados ecossistemas (FOKINE & ROSSMANN, 2014). A descoberta dos fagos ocorreu de forma independente, por pesquisadores de diferentes países, em 1915 Frederick Twort, patologista britânico e em 1917 Félix d’Hérelle, microbiologista Franco-Canadense, foi o segundo que cunhou o termo “bacteriófagos”, que significa algo como “comedor de bactérias”. Esses vírus possuem uma enorme diversidade de material genético e morfologia, estas são características usadas na sua classificação, assim como o espectro e infecção, que é a capacidade de infectar determinado(s) grupo(s) de hospedeiro(s) (ACKERMANN, 2009; CHIBANI *et al.*, 2019).

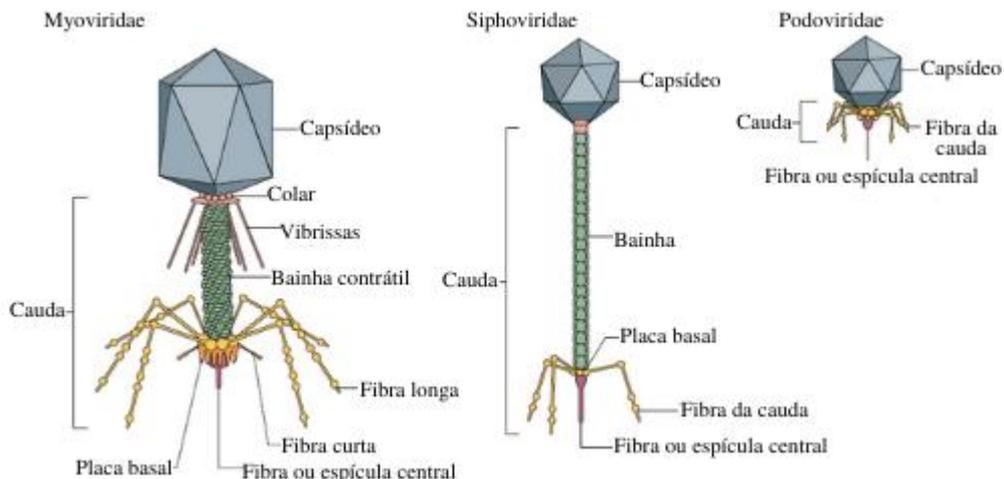
Quanto à morfologia, eles podem ser classificados como filamentosos (*Inoviridae*), poliédricos (*Microviridae*, *Corticoviridae*, *Tectiviridae*, *Leviviridae* e *Cystoviridae*), ou pleomórficos (*Plasmaviridae*). Todos os fagos possuem capsídeos para proteger o ácido nucleico, alguns possuem até mesmo uma camada lipídica interna, como o fago PM2 da família *Corticoviridae*, além disso, grande parte dos fagos possuem cauda e fímbrias (DION, OECHSLIN, MOINEAU, 2020; KASMAN & PORTER, 2019; KING *et al.*, 2011).

Já foram identificados fagos com ácido nucleico dos tipos: simples e dupla fita RNA, simples fita e dupla fita DNA (dfDNA), os bacteriófagos da ordem *Caudovirales* representam a maior parte das sequências de fagos nos bancos de dados nos bancos de dados genômicos (DION, OECHSLIN, MOINEAU, 2020). Em relação ao comprimento, os genomas dos fagos podem variar enormemente, o vírus de procarioto com menor tamanho de genoma possui 2.435 bp, enquanto os maiores genomas entre os bacteriófagos possuem tamanho >400 kb (ALMPANIS *et al.*, 2018; YUAN & GAO, 2017).

Mais de 6.400 fagos já foram analisados por meio de microscopia eletrônica, destes, aproximadamente 96% pertencem à ordem *Caudovirales*, que são vírus de DNA dupla fita e que possuem cauda, e mais de 8.400 tiveram seu genoma sequenciado completamente, sendo

mais de 85% destes pertencentes também a ordem dos vírus com cauda (ACKERMANN & PRANGISHVILI, 2012; DION, OECHSLIN, MOINEAU, 2020). O nome da ordem vem do latim, onde *Caudo* significa “cauda”, e *virales* é o sufixo para ordem de vírus, neste grupo encontram-se as famílias mais conhecidas e estudadas até então: *Siphoviridae*, família com maior número de fagos identificados, um exemplo bem conhecido e estudado é o fago Lambda (λ) capaz de infectar a bactéria *E. coli*, esses vírus possuem cauda longa, flexível e não contrátil; *Myoviridae*, o fago T4, particularmente bem representativo deste grupo, também infecta *E. coli*, como característica marcante destaca-se a presença de cauda longa, reta e contrátil; *Podoviridae*, caracterizados por uma cauda curta e não contrátil, um vírus utilizado como modelo que pertence a este grupo é o fago de *Salmonella* P22 (ACKERMANN, 1998; 2007; 2009; ACKERMANN & PRANGISHVILI, 2012; DION, OECHSLIN, MOINEAU, 2020). As famílias *Herelleviridae* e *Ackermannviridae* foram criadas recentemente, sendo dois grupos muito próximos de *Myoviridae* com morfologia muito similar (DION, OECHSLIN, MOINEAU, 2020). A **Figura 1** ilustra de forma comparativa as três principais famílias da ordem *Caudovirales*.

Figura 1 - Comparação das principais famílias da ordem *Caudovirales*.



Representação das três principais famílias da ordem *Caudovirales*. Fonte: Adaptado de Nobrega et al (2018).

Para invadir uma célula procariótica, o vírus necessita interagir com elementos de reconhecimento que estão dispostos na membrana bacteriana. A susceptibilidade à infecção vai depender da interação entre as proteínas da cauda dos fagos (no caso dos fagos com cauda) com os receptores da superfície da membrana externa das bactérias (WITHEY *et al*, 2005). Os fagos podem ser classificados como monovalentes ou polivalentes, os monovalentes são aqueles que se ligam apenas a um receptor celular e normalmente possuem

um espectro de infecção mais restrito, enquanto os fagos polivalentes podem se ligar em mais de um receptor, tendo assim, normalmente, um amplo espectro infeccioso (JONGE *et al.*, 2018). O espectro de infecção dos fagos pode variar desde cepas específicas de bactérias ou mesmo múltiplas cepas de uma mesma espécie, até diferentes espécies relacionadas (DONLAN *et al.*, 2009).

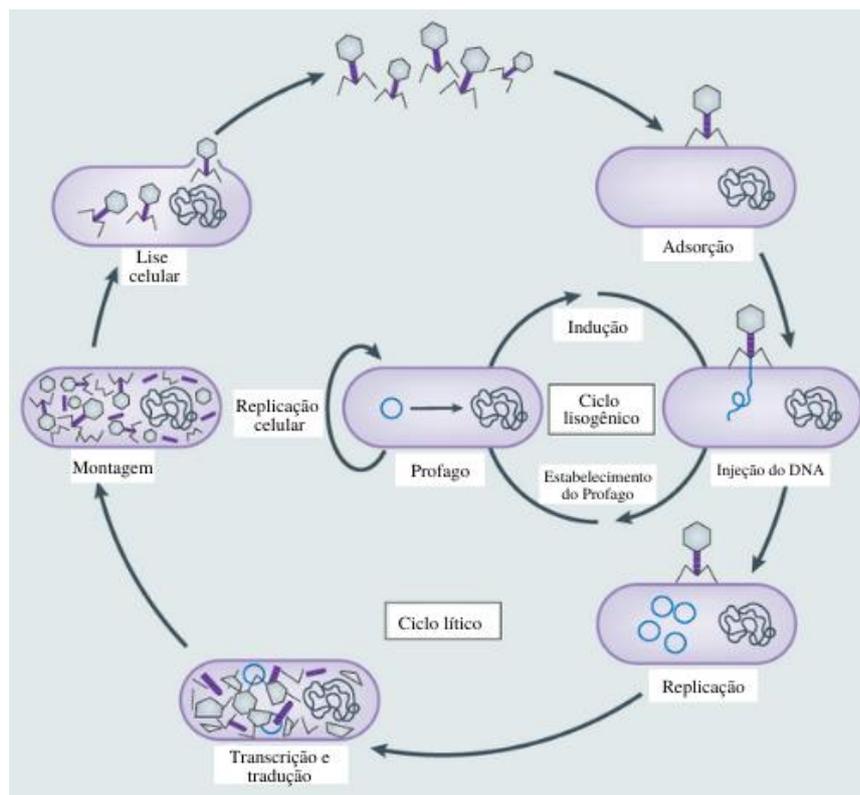
As Proteínas Ligantes de Receptor (*Receptor Binding Protein* ou RBP) são as estruturas mais estudadas na relação de determinação da capacidade de infecção dos fagos. Mutações nos genes destas proteínas podem, em certas ocasiões, alterar o espectro de infecção desses vírus, além disso, outro mecanismo capaz de alterar a capacidade infectiva de um fago, mudando seu hospedeiro alvo, é a troca de RBPs entre fagos distintos (DION, OECHSLIN, MOINEAU, 2020). Os fagos com cauda iniciam o processo infeccioso através da adsorção das proteínas presentes na cauda, as RBPs, com receptores na face externa do hospedeiro. Esses receptores podem ser desde pílus sexual, que caracterizam os fagos chamados de F + ou "male specific", ou outros componentes da superfície como lipopolissacarídeos ou peptidoglicanas, que são os chamados fagos somáticos. Após a adsorção, o fago injeta seu material genético no citoplasma do hospedeiro, através das proteínas da cauda, para isso, enzimas também presentes na cauda, interagem com a parede celular bacteriana rompendo-a, possibilitando assim a entrada do genoma fágico (ACKERMANN, 1998).

No momento de interação das proteínas da cauda com os receptores bacterianos, duas fases distintas ocorrem, a adsorção reversível e irreversível. No caso da adsorção reversível, em geral influenciada por forças eletrostáticas, o fago pode se separar da célula hospedeira, pois nesta etapa, a ligação entre o fago e a bactéria ainda não está completa (SILVA, STORMS & SAUVAGEAU, 2016). Ensaios de criotomografia eletrônica mostram que no caso do fago T4, existe a capacidade de alternar entre conformações estendidas e não estendida das suas 6 fibras longas da cauda (HU *et al.*, 2015). Quando estendida, faz ligação com o receptor bacteriano, e antes mesmo dessa fibra se desligar uma segunda fibra faz outra ligação, essa alternância de ligação das fibras ajuda o fago a encontrar um sítio ótimo para ligação irreversível (HU *et al.*, 2015). A próxima fase da adsorção é a irreversível, nesta etapa ocorre ação de enzimas hidrolíticas para penetração do material genético na célula (SILVA, STORMS & SAUVAGEAU, 2016).

Quanto ao tipo de ciclo de replicação desses vírus, destacam-se dois principais: lítico e lisogênico. No ciclo lítico, brevemente, o fago libera seu genoma na célula hospedeira, esta

usa seu maquinário replicativo para propagar o parasita que logo é liberado do hospedeiro, de forma a causar a lise celular. O ciclo lisogênico caracteriza-se pela formação do profago, que é a forma integrada do fago no material genético da bactéria hospedeira, este processo é reversível e este ciclo pode ser interrompido com agentes estressores ambientais, como luz UV e mutagênicos químicos, induzindo assim o vírus ao ciclo lítico (ACKERMANN, 1998; WITHEY *et al.*, 2005). O ciclo lisogênico pode gerar imunidade no hospedeiro a infecções subsequentes por fagos relacionados ao vírus inicial, um mecanismo que pode gerar essa resistência é a alteração dos receptores celulares do hospedeiro, que pode ser gerado pelos genes do profago, evitando assim que outros fagos consigam adsorver a célula infectada (MARKINE-GORIAYNOFF *et al.*, 2004). A **Figura 2** traz um esquema ilustrativo dos ciclos lítico e lisogênico.

Figura 2 - Os ciclos replicativos dos fagos.



Resumo dos principais ciclos replicativos realizados pelos fagos. Fonte: Adaptado de Salmond e Fineran (2015).

Os bacteriófagos possuem papel importante na evolução da patogenicidade bacteriana, a capacidade de transferência de genes ocorre em especial através dos fagos formadores de profagos. O processo pelo qual bacteriófagos transferem genes que podem beneficiar a bactéria hospedeira é chamado de conversão lisogênica. Um exemplo bem conhecido é o caso

da toxina colérica produzida pela bactéria *Vibrio cholerae*, essa toxina é codificada pelo fago filamentoso CTXΦ (SALMOND & FINERAN, 2015; WALDOR & MEKALANOS, 1996). Através da lise celular causada pelos fagos, genes de resistência a antibióticos ou de virulência podem ser liberados no ambiente, o que ocasionalmente pode levar a eventos de transferência horizontal de genes entre as bactérias que estejam viáveis no ambiente próximo. Eventos de transferência horizontal de genes ocorrem normalmente também por transdução, mecanismo no qual o fago empacota genes da bactéria junto dos seus e transfere para o próximo hospedeiro em infecções subsequentes (BRUSSOW, CANCHAYA & HARDT, 2004; SALMOND & FINERAN, 2015).

O estudo das aplicações biotecnológicas dos fagos tem se aprofundado nos últimos anos. A utilização desses vírus baseia-se em especial na especificidade parasito-hospedeiro, o que tende a garantir uma maior segurança para a sua utilização, se isolados e selecionados corretamente. A caracterização genética e fenotípica de bacteriófagos terapêuticos necessita de ser detalhada a fim de evitar características desfavoráveis como, por exemplo, genes de resistência, genes de virulência e genes associados à lisogenia (ALTAMIRANO & BARR, 2019; HAABER *et al.*, 2016; PRINCIPI, SILVESTRI & ESPOSITO, 2019). Os fagos podem ser utilizados como tratamentos para infecções bacterianas, processo conhecido como fagoterapia. Neste processo, fagos com ciclo estritamente lítico costumam ser mais indicados, isso se deve ao fato destes não se integrarem ao genoma do hospedeiro e ficarem latentes (DRULIS-KAWA, MAJKOWSKA-SKROBEK & MACIEJEWSKA, 2015). Estudos já relataram resultados positivos do uso de coquetéis contendo bacteriófagos para o tratamento de infecções bacterianas, estes resultados estão relatados em diversas revisões (ABEDON, 2018; ALTAMIRANO & BARR, 2019; LIU *et al.*, 2021; PRINCIPI, SILVESTRI & ESPOSITO, 2019).

A aquisição de resistência pelo hospedeiro aos fagos é uma consequência natural do processo infeccioso. Coquetéis fágicos são indicados para prevenir o mecanismo de aquisição de resistência pelas bactérias, quando se utiliza bacteriófagos para tratamento de contaminações. Os coquetéis são formulações contendo diferentes fagos que podem ou não possuir alvos diferentes para o mesmo patógeno que se deseja eliminar, aumentando assim as possibilidades de alvos na célula bacteriana diminuindo as possibilidades de resistência e escape (DRULIS-KAWA, MAJKOWSKA-SKROBEK, MACIEJEWSKA, 2015). Há diversas preparações de coquetéis bacteriofágicos para aplicação em produtos alimentícios,

LISTEX P100 (Microcos) e o ListShield (Intralytix) são exemplos desses produtos, ambos coquetéis podem ser utilizados para prevenção de contaminação por *Listeria monocytogenes* em comida processada (SALMOND & FINERAN, 2015).

A aplicação de fagos ou coquetéis de fagos na pecuária é uma realidade que possui a vantagem de controlar patógenos que podem contaminar a água e os alimentos sem alteração nas suas propriedades organolépticas, essa biotecnologia também possui baixo custo de produção, além disso, os bacteriófagos são entidades autoreplicativas e de baixa toxicidade (WÓJCIK *et al.*, 2020). A aplicação de fagos e posterior redução da concentração de bactérias em situações diversas na pecuária e agropecuária já foram demonstradas em diversos estudos (CLAVIJO *et al.*, 2019; SHARMA *et al.*, 2009; WÓJCIK *et al.*, 2020).

Outras aplicações biotecnológicas envolvendo os bacteriófagos ou suas enzimas incluem: endolisinas, que são enzimas codificadas pelos fagos, são alvos de muito estudo (BRIERS, 2019; DRULIS-KAWA, MAJKOWSKA-SKROBEK & MACIEJEWSKA, 2015; LI, WANG & TANG, 2020), essas enzimas são responsáveis pelo rompimento da parede celular bacteriana, já existe uma endolisina disponível no mercado para tratamento de infecções de pele em humanos causadas por *Staphylococcus aureus*, a Staphefekt (Microcos), que é inclusive o primeiro produto a base de endolisinas disponível comercialmente (SALMOND & FINERAN, 2015). Uso de fagos para detecção de patógenos em produtos alimentícios; os bacteriófagos possuem vantagens em relação a métodos tradicionais de identificação de patógenos (ex. *Polymerase Chain Reaction* -PCR- e ensaios imunológicos) como a manipulação de baixo custo, além de características naturais de sua história coevolutiva com seus hospedeiros (especificidade, identificação de células vivas, funcionamento em condições adversas, etc), o que permite seu uso para identificação destes hospedeiros (SCHMELCHER & LOESSNER, 2014).

Já se propôs também, a utilização de fagos lisogênicos para aumentar a eficácia de antibióticos, isso é possível pela transferência de genes que aumentam a sensibilidade aos antibióticos, ou até mesmo, o uso desses vírus como veículos de antibióticos, levando esses agentes químicos diretamente para as células alvo (EDGAR *et al.*, 2012; YACOBY, BAR & BENHAR, 2020). Em alguns casos, a pressão seletiva exercida sobre as bactérias na direção de gerar resistência contra os bacteriófagos, pode levar a eventos de *trade-off*, no qual a bactéria acaba perdendo a resistência aos antibióticos em detrimento da resistência aos vírus (CHAN *et al.*, 2016).

A formação de biofilmes também é um problema que afeta diversas áreas essenciais para a economia, como a indústria alimentícia e mesmo a área médica, por exemplo. Os biofilmes são formas organizacionais de colônias de bactérias. Nos biofilmes, as colônias estão cercadas por substâncias extracelulares poliméricas, a função primordial desse arranjo é conferir uma maior defesa e estabilidade para esses organismos (HARPER *et al.*, 2014). Já se demonstrou que o uso de bacteriófagos isolados, assim como com coquetéis com ao menos dois fagos, bem como o uso das suas enzimas, apresenta bons resultados no processo de desagregação dos biofilmes, contendo uma ou mais espécies de bactérias (CURTIN & DONLAN, 2006; GUTIÉRREZ *et al.*, 2015; HARPER *et al.*, 2014; LEHMAN & DONLAN, 2014; MELO *et al.*, 2016).

Os fagos, em especial as formulações de coquetéis bacteriofágicos, quando isolados e caracterizados adequadamente, mostram-se grandes aliados no combate às bactérias patogênicas, em especial quando utilizados ao lado dos antibióticos, devido ao fato de serem organismos que replicam e evoluem, característica importante no combate a bactérias resistentes aos antibióticos (CZAPLEWSKI *et al.*, 2016). É estimado que menos de 0,0002% da diversidade de fagos tenha sido verificada, sendo que aproximadamente 96% destes correspondem à ordem *Caudovirales*, além disso, pouco se sabe sobre o papel ecológico dos vírus em grande parte dos ecossistemas (ACKERMANN, 2007; ROHWER *et al.*, 2009; ZRELOVS, DISLERS & KAZAKS, 2020). Tendo em vista a importância desses organismos, tanto para saúde humana, quanto animal e ambiental, o que determina a saúde única, além do crescente surgimento de bactérias multirresistentes, se faz necessário a realização de mais estudos como este, que visam a busca por novos fagos com potencial lítico. Tendo em vista o cenário relatado nesta introdução, o presente trabalho levanta a hipótese: é possível isolar bacteriófagos capazes de infectar e lisar enterobactérias, através de amostras de dejetos provindos da pecuária?

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo Geral

Isolar, propagar e caracterizar fagos capazes de infectar, *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, a partir de resíduos da pecuária brasileira (fezes de aves, cama de aviário e dejetos de suínos), de fazendas e granjas do Oeste do estado de Santa Catarina.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar os fagos quanto à sua morfologia por meio de microscopia eletrônica;
- Sequenciar os genomas, montar, anotar e atribuir classificação taxonômica aos bacteriófagos isolados;
- Buscar possíveis genes identificados nos bacteriófagos que estejam envolvidos na taxonomia viral, resistência a antibióticos e lisogenia.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras de dejetos da pecuária catarinense

Foram coletadas randomicamente 112 amostras provenientes de fazendas e granjas produtoras de aves, suínos e bovinos provenientes do Oeste de Santa Catarina-Brasil. Coletou-se amostras de efluente de saída de biodigestor de dejetos suinícolas, camas de aviários e fezes brutas de aves (frango de corte). As amostras foram acondicionadas a temperatura de 4 C° até sua utilização, a eluição das amostras foi feita com tampão salino fosfato 1% (PBS) em pH 7,0 e filtradas por um filtro de celulose de 0,22 µM.

2.2 Bactérias hospedeiras

As enterobactérias utilizadas como hospedeiras alvo dos bacteriófagos são: *Salmonella enterica* Typhimurium (ATCC® 1402®), *Enterobacter aerogenes* (NCTC 10006®) e *Klebsiella pneumoniae* (WDCM 00097®).

Essas bactérias foram propagadas em 25 mL de meio *Brain Heart Infusion* - BHI-líquido, alíquotas de 1,5 mL dessa cultura em crescimento exponencial (densidade óptica [DO] de 0,6) foram conservadas a 30% de glicerol em -80°C, para uso como inóculo, quando necessário.

2.3 Infecção bacteriofágica *in vitro*

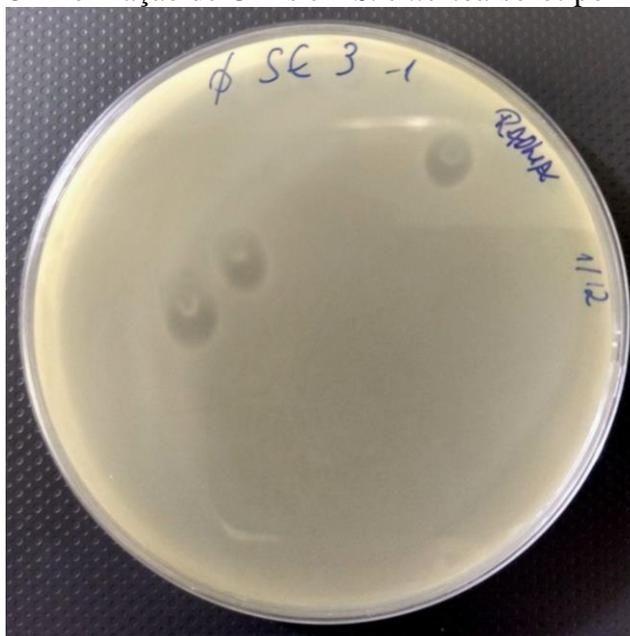
Para induzir uma infecção bacteriofágica, foi aplicado em uma placa de petri contendo 10 mL de meio BHI sólido (*bottom agar*), 1 mL da bactéria host (DO 0,6) e 1 mL da amostra filtrada (que possivelmente continha os fagos). Posteriormente, 3 mL de meio ágar semissólido (0,7% - *top agar*) foi adicionado e vertido em placa de cultura bacteriana. As placas foram incubadas em estufa a 37°C, por períodos variáveis de tempo, até observar-se a capacidade lítica de bacteriófagos. Foram contabilizadas as Unidades Formadoras de Placas (UFP), pontos claros que indicam as áreas de ocorrência de infecção e lise celular, a fim de calcular o título viral (KESIK-SZELOCH *et al.*, 2013; ADAMS, 1959).

2.4 Isolamento e purificação dos fagos

A partir do perfil das UFP nas placas de petri coletou-se as áreas de replicação viral e os bacteriófagos foram novamente propagados de acordo com o descrito no item 2.3, para fins de isolamento de uma única linhagem viral. Essas passagens foram sucessivas até alcançar perfil único de placas de lise, possivelmente indicando a presença de único fago.

De posse desses isolados, as UFPs foram lavadas para fim de eluição viral utilizando 1 ml de solução SM (ANDREWS-PFANNKOCH *et al.*, 2010). Em seguida, transferidas para um microtubo de 1,5 mL onde ocorre a ressuspensão dos fagos à 17°C e agitação de 150 rpm . Posteriormente as amostras foram centrifugadas por 10 min, 3.000 xg 4°C e filtradas por membrana de 0,22 µM para remoção de células bacterianas restantes (HUNGARO *et al.*, 2013; ADAMS, 1959). A **Figura 3** ilustra a formação de placas em *S. enterica* serovar Typhimurium pelo processo de lise celular a partir de um foco viral, é a partir dessas UFPs que se realiza o isolamento.

Figura 3 - Formação de UFPs em *S. enterica* sorotipo Typhimurium.



Processo de formação de UFP a partir da lise viral.

2.5 Titulação dos fagos e determinação da virulência

A fim de determinar o título viral de cada amostra analisada, foi realizada a contagem das UFPs. O título viral foi calculado de acordo com a **Equação 1**.

Equação 1 - Contagem de placas de lise:

$$UFP/mL = NP * RD / V$$

Onde:

NP - nº de placas contabilizadas

RD: recíproca da diluição utilizada

V: Volume utilizado

2.6 Caracterização por microscopia eletrônica

Para a caracterização da morfologia dos fagos foi utilizado o microscópio eletrônico de transmissão (JEM-1011 TEM [TEM 100 kV]). Os fagos foram propagados e purificados a fim de gerar uma amostra mais limpa e concentrada de vírus. As amostras foram centrifugadas (~3000 xg a 4°C por 10 min) e posteriormente filtrou-se o sobrenadante em filtro de 0,22µM.

Alíquotas de 10µL de cada amostra contendo um putativo fago isolado e purificado foram aplicadas sobre uma tela de microscopia eletrônica de 200-300 mesh, de cobre, previamente revestidas com carbono.

Após a aplicação das amostras, as telas são incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos, em seguida é realizada a remoção do excesso de amostra com o auxílio de papel filtro. Cada tela foi então eluída separadamente sobre uma gota de contrastante, por 5 minutos. Foi utilizado o acetato de uranila 2% (pH 4,5) como contrastante para o processo de visualização. O excesso de contrastante foi removido com papel filtro, após, deve-se realizar uma incubação mínima de 40 minutos à temperatura ambiente antes da deposição da tela na caixa de armazenamento (GREGORACCI, 2006).

2.7 Extração do material genético e sequenciamento genômico

A extração do material genético foi realizada a partir de suspensão de bacteriófagos isolados e propagados, filtradas em filtro de 0,22 µM para remoção de bactérias hospedeiras. Ainda, essas amostras passaram por tratamento enzimático, usando 1 U/µL de DNase I e RNase I (Sigma-Aldrich), para degradar genomas restantes advindos de bactérias. Em seguida houve bloqueio das atividades enzimáticas usando inibidor de DNase/RNase (Sigma-Aldrich) e temperatura de 65°C por 15 minutos. A extração do material genético viral foi realizada usando kit PureLink® Viral RNA/DNA Kit Life Technologies. Resumidamente na primeira etapa foi preparado o lisado, onde para cada amostra usou-se um microtubo estéril de 1,5 mL, adicionando 25 µL de Proteinase K com 200 µL da amostra e 200 µL da solução de tampão de lise com o RNA Carrier, em seguida foi vortexado durante 15 segundos sendo posteriormente incubado na temperatura de 56°C durante 15 minutos. Após o tempo de

incubação foi adicionado 250 μ L de etanol 96-100%, vortexado durante 15 segundos novamente e por fim incubado por mais 5 minutos em temperatura ambiente.

A terceira etapa, o processo de purificação, o material lisado foi transferido para tubos contendo uma coluna de extração e centrifugado a 6.800x rcf durante 1 minuto, sendo descartado o tubo coletor contendo o filtrado. A coluna de extração foi lavada com 500 μ L do tampão de lavagem e centrifugado novamente na mesma velocidade e duração, este passo foi repetido por 3 vezes. Após a última repetição transferiu-se a coluna de extração para um microtubo estéril, no qual os ácidos nucleicos foram coletados e adicionou-se à coluna 30 μ L de água RNase free incubado a 1 minuto em temperatura ambiente, para a eluição dos ácidos nucleicos. Posteriormente o microtubo contendo a coluna de extração foi centrifugado na velocidade máxima da centrífuga durante 1 minuto e em seguida a coluna de extração foi descartada e o microtubo que contém os ácidos nucleicos eluídos foram armazenados a -80°C para análises futuras. O material genético extraído foi enviado à empresa especializada, para a realização do sequenciamento paired-end através da plataforma MiSeq - Illumina, considerando 1 milhão de *reads* de cobertura.

2.8 Montagem e análise dos genomas virais

As montagens dos genomas foram realizadas a partir das plataformas online *Genome Detective* versão 1.133, pipeline responsável também pela remoção das sequências de baixa qualidade através da ferramenta Trimmomatic, já a qualidade dos *reads* foi aferida pela ferramenta FastQC (VILSKER *et al.*, 2018), enquanto o pipeline Prokka versão 1.14.0, através do prodigal foi utilizado para a predição e anotação gênica (SEEMANN, 2014).

2.9 Busca por genes de resistência a antibióticos no genoma dos fagos

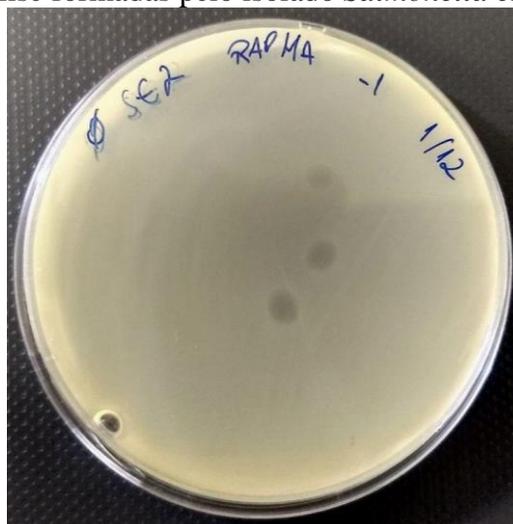
A procura por genes de resistência a antibióticos no genoma dos fagos foi realizada através da ferramenta de linha de comando RGI 5.2.0 (*Resistance Genes Identifier*) da base de dados CARD 3.1.4 - *Comprehensive Antibiotic Resistance Database* (MCARTHUR *et al.*, 2013).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Isolamento viral

Todas as amostras quando submetidas ao teste do duplo ágar demonstraram perfis com tamanhos e opacidades diferentes de placas de lise, foi então selecionado e isolado um perfil específico de placa para cada um dos testes. Foram isolados vírus para as bactérias hospedeiras *S. enterica* serovar Typhimurium, *E. aerogenes* e *K. pneumoniae*. Os padrões das placas para fagos de *S. enterica* se apresentaram mais nítidos, assim o seu isolamento foi mais facilmente efetivado. As UFPs que surgiram para *E. aerogenes* e *K. pneumoniae* não se apresentaram em padrões tão claros, nestes casos todo o ágar superior foi eluído com 1 mL de SM buffer. A **Figura 4** apresenta exemplos de placas de lise do processo de isolamento viral.

Figura 4 - Placas de lise formadas pelo isolado *Salmonella enterica* Phage SECF1.



Perfil de lise realizado pelo isolado SECF1.

Foram isolados 5 perfis de placas de lise. O fago *Salmonella enterica* Phage SM1 foi isolado a partir de amostra de dejetos suínos da saída de biodigestor, *Salmonella enterica* Phage SECF1 foi isolado de amostra de fezes de galinha, *Salmonella enterica* Phage SEPL1 de cama de aviário, enquanto os vírus *Enterobacter aerogenes* Phage EASM1 e *Klebsiella pneumoniae* Phage KPSM1 foram isolados de amostra de dejetos suínos de saída de biodigestor. A nomenclatura dos fagos foi escolhida considerando o tipo de amostra do qual foram isolados. A sigla SM, que foi usada como identificador para alguns dos isolados, se refere à *Swine Manure* (dejetos suínos), em alusão às amostras das quais os vírus foram isolados. Os identificadores PL e CF advêm dos termos *Poultry Litter* e *Chicken Feces*, respectivamente, também em relação à origem da amostra de isolamento. O número 1 refere-

se ao fato de serem os primeiros fagos isolados pelo laboratório para cada *host* a partir dessas matrizes. As siglas SE, EA e KP referem-se às espécies *S. enterica* serovar Typhimurium, *E. aerogenes* e *K. pneumoniae*, foram adicionadas ao nome para possibilitar um identificador específico para os dois isolados. Para a definição dos nomes seguiu-se o guia informal sugerido por Adriaenssens e Brister (2017).

A reprodução dos testes para propagação e isolamento, em especial nos casos dos fagos de *E. aerogenes* e *K. pneumoniae*, foram mais trabalhosos, nem sempre foi possível observar o processo lise celular, além disso os testes foram interrompidos durante a pandemia de Covid-19. Os isolados foram armazenados em refrigeração a 4°C, sem utilização de nenhum tipo de criopreservante, estudos relatam o decaimento na concentração viral quando expostos a diferentes temperaturas, o que pode explicar a dificuldade na propagação destes vírus (GONZÁLEZ-MENÉNDEZ *et al.*, 2018; JOŃCZYK *et al.*, 2011; OTTOSSON & STENSTRÖM, 2003; SHAN *et al.*, 2014).

Ottosson e Stenström (2003) analisaram o decaimento de colifagos somáticos, e relatam que o decaimento desses vírus foi maior a 20°C do que a 4°C, a queda na concentração viral apresenta um padrão logaritmo a partir do dia 0. Em outro estudo (SHAN *et al.*, 2014) observou-se que há uma relação entre mudança de temperatura e o tipo de ciclo replicativo do fago, quando submetidos a temperaturas por volta de 37°C os fagos tendem a realizar o ciclo lítico, enquanto em temperaturas mais baixas, por volta de 25°C eles se mantiveram no ciclo lisogênico. Os isolados do presente estudo podem ter passado por processos semelhantes, entrando em lisogenia ou mesmo terem sido inativados quando em armazenamento. González-Menéndez *et al.* (2018) analisaram a estabilidade de fagos (*Siphoviridae* e *Myoviridae*) isolados em seu laboratório, os fagos pertencentes a família *Myoviridae* tiveram um decaimento maior que os da outra família quando armazenados em meio TBS a 4°C sem adição de preservantes, a queda do título viral chegou até a 3 log.

3.2 Microscopia eletrônica

Em decorrência da pandemia de Covid-19 o acesso a determinados espaços da Universidade foram limitados, assim, as análises por meio de microscopia eletrônica não foram realizadas, exceto por uma análise prévia realizada com o isolado SM1. A **Figura 5** foi o melhor resultado obtido nessa análise inicial.

Análises por microscopia eletrônica são essenciais na caracterização de bacteriófagos já que permitem a visualização das características físicas do vírion, bem como frequentemente permitem a identificação imediata da taxonomia do fago (ACKERMANN & PRANGISHVILI, 2012).

Figura 5 - Imagem gerada por microscopia eletrônica do isolado SM1.

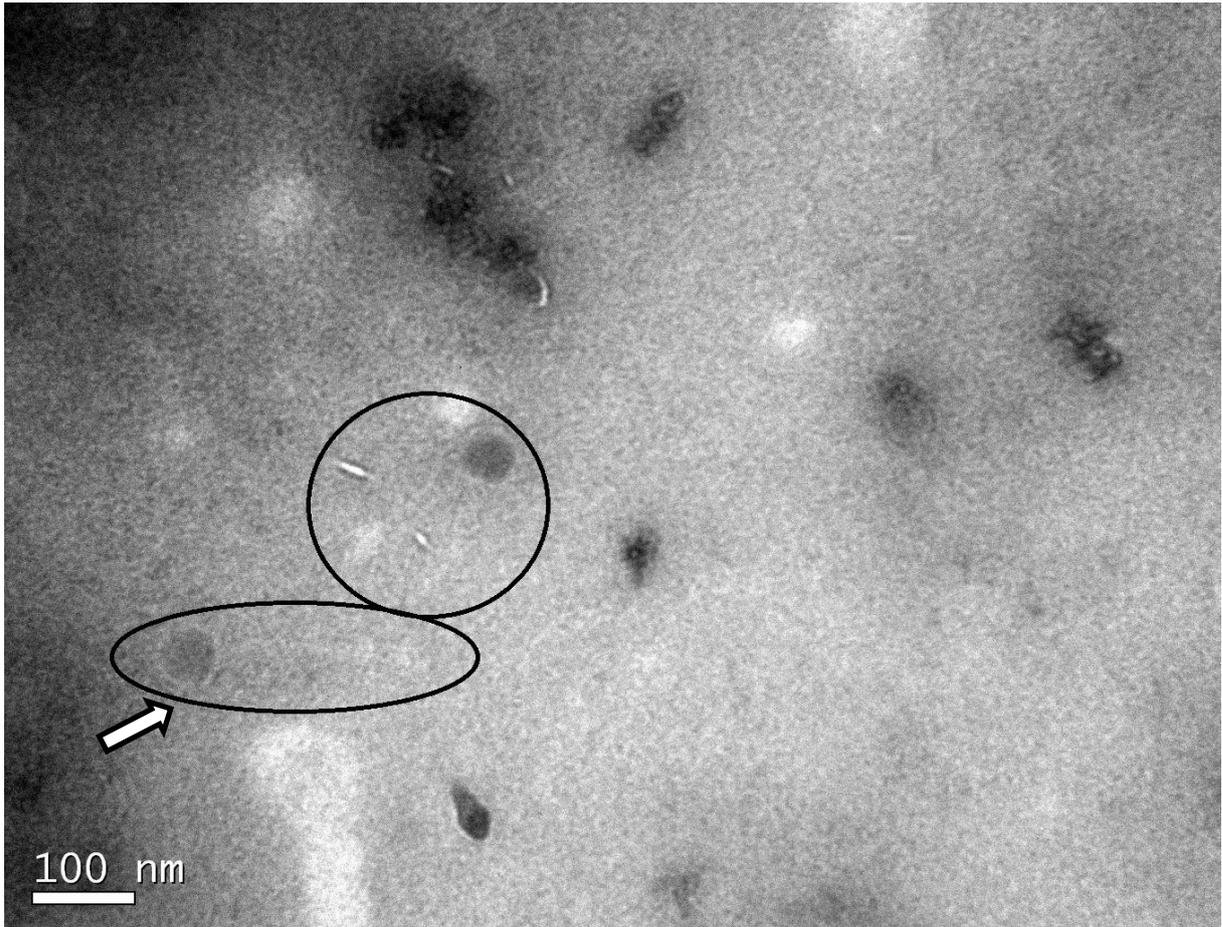


Imagem produzida por meio de microscopia eletrônica de transmissão (magnificação 100k) referente ao isolado SM1.

Na imagem é possível observar um capsídeo icosaédrico, com aproximadamente 50 nM bem como uma cauda longa com aproximadamente 200 nM. O fago apontado pela seta na imagem parece ter uma leve inclinação na parte inicial da cauda (mais próxima do capsídeo), o que pode indicar flexibilidade da cauda, assim, caso o vírus esteja intacto essas características sugerem que este fago pertence à família *Siphoviridae* (DAVIDSON *et al.*, 2011; FOKINE & ROSSMANN, 2014). Determinadas etapas agressivas nos processos de purificação viral para preparação em *grid* podem danificar as partículas, alguns dados sugerem que esse dano pode ocorrer em especial nos fagos *Siphoviridae*, o que pode levar em última instância a erros na classificação do fago (WILLIAMSON; HELTON; WOMMACK,

2011). Análises mais aprofundadas por microscopia seriam necessárias para descartar possíveis erros.

3.3 Título viral, extração do material genético e sequenciamento

A **Tabela 1** apresenta os dados obtidos para o título viral obtido na última propagação antes do envio para sequenciamento, bem como os valores de quantidade de material genético que foram enviados após a extração. A **Tabela 2** traz os resultados do sequenciamento, tanto os dados brutos quanto a quantidade de *reads* após o processo de trimagem.

Tabela 1 - Título viral e quantidade de material genético enviado para SNG.

Isolado	Título Viral	RNA (ng/uL)	DNA (ng/uL)
SM1	$>10^8$ PFU/mL	22	23,5
SECF1	$1,04 \times 10^6$ PFU/mL	20,4	24
SEPL1	$>10^8$ PFU/mL	64,4	78,5
EASM1	3×10^3 PFU/mL	56,8	74
KPSM1	$1,14 \times 10^6$ PFU/mL	44,4	58,5

Tabela 2 - Resultados do sequenciamento.

Isolado	Reads brutos	Reads após limpeza
SM1	653.147	600.629
SECF1	704.109	652.807
SEPL1	636.343	571.343
EASM1	848.426	713.222
KPSM1	1.035.382	757.528

3.4 Montagem e análises dos genomas

Os genomas foram montados através da abordagem *de novo* por meio do *software online Genome Detective* versão 1.133, além de realizar a montagem, o *pipeline* possui uma ferramenta que atribui classificação taxonômica aos genomas. A ferramenta se baseia na disponibilidade de genomas de referência no banco de dados RefSeq. O *software* gera

resultados de similaridade baseados nos *contigs* que foram detectados em nível de nucleotídeos e aminoácidos, gerando pontos para nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa) que irão gerar uma pontuação total, os melhores resultados de cada *contig* são usados para o alinhamento (VILSKER *et al.*, 2018).

Os melhores resultados de identificação foram selecionados, tendo como critério os valores mais altos de porcentagem de cobertura da sequência montada em comparação a sequência referência, a profundidade dessa cobertura bem como a identidade dos pontos totais de nt/aa. O pipeline removeu 93% dos *reads*, a montagem do genoma do isolado SM1 iniciou com 36.163 *reads*, destes, 44% foram montados em contigs virais, o conteúdo GC foi de 54%. O isolado SM1 foi identificado com baixa cobertura e profundidade através da ferramenta de classificação do *Genome Detective* como o vírus da base de dados *Salmonella phage* BP12C com cobertura de 14,3% e profundidade de cobertura de 3X, BP12C pertence à família *Siphoviridae* (ICTV, 2020). SM1 também teve um resultado de alinhamento relevante com *Salmonella virus* f18SE, que também é um fago da família *Siphoviridae* (SEGOVIA *et al.*, 2015), a cobertura total foi de 72,7% do genoma e a profundidade de 61X.

O processo de montagem do genoma do isolado SECF1, começou com 498.851 *reads* (23% dos 652.807 *reads* foram removidos na filtragem), dos quais 91% foram utilizados para montagem de contigs virais, o conteúdo GC foi calculado em 48%. As sequências montadas foram mais relacionado com os vírus *Klebsiella phage* vB_KpnM_BIS47 com cobertura de 63% do genoma referência e profundidade 13 *reads*, o vírus *Proteus phage* Mydo com cobertura de 70,9% e 15,9X de profundidade, ambos os fagos pertencem a família *Myoviridae* (JONES *et al.*, 2019; LABUDDA *et al.*, 2017). Além disso, o fago *Salmonella virus* FSLSP088 também foi identificado com cobertura de 56,5% e profundidade de 8,8X. FSLSP088 é um vírus pertencente à família *Siphoviridae* (ICTV, 2020).

O isolado SEPL1 iniciou a montagem com 539.054 *reads* (52% dos *reads* foram removidos na filtragem), dos quais 84% foram montados em contigs virais, o resultado de qualidade foi de 44% de conteúdo GC. A identificação do vírus SEPL1 pela ferramenta teve os melhores resultados para 7 fagos específicos, 5 pertencentes à família *Myoviridae* (ICTV, 2020; JONES *et al.*, 2019; LABUDDA *et al.*, 2017), 1 da família *Ackermannviridae* (ICTV, 2020) e outro da família *Siphoviridae* (SEGOVIA *et al.*, 2015). Os fagos identificados são: *Proteus phage* Mydo, 75.7% de cobertura e 88,6X de profundidade, *Klebsiella virus* KpS8, 79.3% de cobertura e 78X de profundidade de cobertura, *Klebsiella phage* vB_KpnM_BIS47,

75.4% de cobertura e 70,1X de profundidade, *Salmonella virus* BPS17L1 73.5% de cobertura e 9,9 de profundidade, *Salmonella virus* Si3 71% de cobertura e 7,9X de profundidade, *Salmonella virus* SKML39 70,8 de cobertura e 246,9 de profundidade e *Salmonella virus* f18SE com cobertura de 81,2% e profundidade de 188,6.

A montagem do isolado EASM1 iniciou com 155.499 *reads* (78% dos *reads* foram removidos), 91% foram montados em contigs virais, 53% foi o resultado do teste de qualidade para conteúdo GC. O isolado foi identificado como um vírus da família *Siphoviridae* (PHOTHAWORN *et al.*, 2019), *Salmonella virus* SPN19 com 48,2% de cobertura e 80X de profundidade. Por fim, o isolado KPSM iniciou o processo de montagem com 186.735 *reads* (75% dos *reads* foram filtrados), dos quais 67% foram montados em contigs virais, quanto ao conteúdo GC obtido foi 48%. Este isolado teve seu genoma mais relacionado com os vírus *Klebsiella phage* phiKO2 com 40,9% de cobertura e 8,6X de profundidade de cobertura, família *Siphoviridae* e *Shigella virus* Sf22, 64,7% de cobertura e 123,5X de profundidade, sendo da família *Myoviridae* (ICTV, 2020). A **Tabela 3** sintetiza os dados descritos acima obtidos no processo de montagem dos genomas. Conforme pode ser observado na **Tabela 3**, alguns resultados da identificação demonstram uma profundidade menor que 30X em relação à cobertura do genoma, sendo assim, estes dados possuem uma menor confiabilidade.

Tabela 3 - Identificação taxonômica a partir da montagem dos isolados via *Genome Detective*.

Isolado	Melhor identificação	Reads	Contigs	Cobertura %	Profundidade da cobertura	Identidade (% nt/aa)	Família
SM1	<i>Salmonella phage</i> BP12C	142	7	14,3	3	98,4/ 98,9742	<i>Siphoviridae</i>
	<i>Salmonella virus</i> f18SE	10.126	5	72,7	61	88,7/ 93,3	<i>Siphoviridae</i>
SECF1	<i>Klebsiella phage</i> vB_KpnM_BIS 47	92.823	125	63	13	99,526/ 99,3352	<i>Myoviridae</i>
	<i>Proteus phage</i> Mydo	7.986	98	70,9	15,9	99,5441/ 99,4237	<i>Myoviridae</i>
	<i>Salmonella virus</i> FSLSP088	33.599	38	56,5	8,8	99,3364/ 99,5064	<i>Siphoviridae</i>
	<i>Proteus phage</i> Mydo	109.814	55	75,7	88,6	99,7341/ 99,7048	<i>Myoviridae</i>

SEPL1	<i>Klebsiella virus</i> KpS8	60.468	84	79,3	78	99,7/ 99,6	<i>Myoviridae</i>
	<i>Salmonella virus</i> BPS17L1	4.202	85	73,5	9,9	9,9/ 9,5	<i>Myoviridae</i>
	<i>Klebsiella phage</i> vB_KpnM_BIS 47	53.021	113	75,4	70,1	99,6/ 99,6	<i>Myoviridae</i>
	<i>Salmonella vírus</i> Si3	3.005	99	71	7,9	99,8/ 99,5	<i>Myoviridae</i>
	<i>Salmonella virus</i> SKML39	189.558	22	70,8	246,9	87/ 88,2	<i>Ackermannvi ridae</i>
	<i>Salmonella virus</i> f18SE	43.527	5	81,2	188,6	89,7/ 92,7	<i>Siphoviridae</i>
EASM1	<i>Salmonella virus</i> SPN19	28.554	114	48,2	80	99,2295/ 98,4288	<i>Siphoviridae</i>
KPSM1	<i>Klebsiella phage</i> phiKO2	21.110	9	40,9	8,6	75,7325/ 79,6075	<i>Siphoviridae</i>
	<i>Shigella virus</i> Sf22	107.664	17	64,7	123,5	94,6972/ 95,8202	<i>Myoviridae</i>

A predição/anotação gênica foi realizada através do *pipeline* automatizado de anotação Prokka versão 1.14.0, as **Tabelas 4 a 8** resumem os resultados obtidos, neles estão descritos o nome de cada gene, bem como seu tamanho e produto. Os genes foram manualmente organizados conforme suas funções para a manutenção viral.

Os bacteriófagos SM1 (**Tabela 4**), SECF1, SEPL1 e KPSM1 apresentaram diversos genes codificadores de cauda, dentre esses, aparecem genes para a bainha, essa estrutura é diagnóstica de vírus pertencentes à família *Myoviridae*, que são vírus que possuem cauda reta, longa e contrátil, a estrutura que circunda o tubo da cauda é responsável pela contração da cauda (FOKINE & ROSSMANN, 2014; MILLER *et al.*, 2003). Presença de cauda complexa geralmente é característica de fagos da família *Myoviridae*.

Tabela 4 - Classificação funcional das proteínas produzidas pelos genes do fago SM1.

Funções	Gene	Tamanho (Bp)
Estrutura da cauda		
Baseplate protein X	X_1, X_2, X_3	213,207, 207
Tail spike protein	9	1407
Tail needle protein gp26	-	699
Tail tube protein	FII_1, FII_2	504, 516
Tail sheath protein	FI_1, FI_2	1176, 1170
Peptidoglycan hydrolase gp4	4	483
Estrutura do capsídeo		
Major capsid protein	-, ORF4	1272, 996
Portal protein e Portal protein B	1, B	1680, 2166
Capsid proteins	N	1023
Capsid assembly scaffolding protein	O	831
Reguladores do ciclo replicativo viral e metabolismo do hospedeiro		
Repressor protein C2	C2_1, C2_2	678, 723
Protein rexB	rexB	432
Terminase, large subunit	A	2025
Methyltransferase Dmt	dmt	813
Negative regulator of transcription	Ner	237
Regulatory protein mnt	mnt	252
Regulatory protein cro	Cro, CRO	186, 219
Serine recombinase gin	gin_1, gin_2, gin_3	564, 375, 564
Lise celular		
Endolysin A e Endolysin	-	564, 489
Spanin, inner membrane subunit	Rz	456

Apesar de apresentarem genes codificadores de estruturas características da família *Myoviridae*, os isolados SM1, SECF1 (**Tabela 5**) e SEPL1 tiveram genes codificadores de proteínas chamadas de *Tail needle protein* gp26 anotadas. Essa proteína é parte da estrutura da cauda do fago *Salmonella phage* P22 um vírus da família *Podoviridae*, grupo que engloba os vírus de cauda curta e não contrátil, a gp26 é uma estrutura que se encontra ligada ao tubo da cauda e auxilia na perfuração da célula alvo (FOKINE & ROSSMANN, 2014; LEAVITT *et al.*, 2013). Esses mesmos três isolados citados acima também apresentaram nas análises, genes codificadores de *Peptidoglycan hydrolase* gp4, um fator acessório da cauda do vírus P22, proteína que além de ser importante para estruturação da cauda, já teve sua capacidade de hidrolisar peptidoglicanas demonstrada (MOAK & MOLINEUX, 2003; OLIA *et al.*, 2006). O gene codificador de DNA *transfer protein* gp7 também foi encontrado nos fagos SECF1 e SEPL1, gene este que está presente também no fago P22 (BYL & KROPINSKI, 2000).

Tabela 5 - Classificação funcional das proteínas produzidas pelos genes do fago SECF1.

Funções	Gene	Tamanho (Bp)
Estrutura da cauda		
Tail tube protein	-	534
Tail sheath protein	-	1896
Baseplate wedge protein gp25	-	381
Tail spike protein	9, 9_1, 9_2, 9_3	2004, 2004, 450, 375
Tail needle protein gp26	-	639
Baseplate protein X	X	204
DNA transfer protein gp7	7	690
Peptidoglycan hydrolase gp4	4_1, 4_3, 4_4	501, 501, 483
Estrutura do capsídeo		
Major capsid protein	-, 5, ORF4_1, E, ORF4_2	1068, 1323, 1293, 1014, 1065, 1107
Portal protein	-, 1	1695, 2178
Head completion/stabilization protein	L	366
Portal protein B	B	1680
Scaffolding protein	8	912
Reguladores do ciclo replicativo viral e metabolismo do hospedeiro		
DNA polymerase processivity component	-	669
ATP-dependent DNA helicase uvsW	uvsW	1509
DNA-directed DNA polymerase	-	3000
ATP-dependent helicase 41	-	1425
Recombination and repair protein	UVSX	1086
Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit	I4L e -	2283, 2235, 2199
Ribonucleoside-diphosphate reductase 1 subunit beta e alpha	nrdB_1, nrdA_1, nrdB_2, nrdA_2, nrdB_3, nrdA_3	1104, 2283, 1089, 2313, 1074, 2235
DNA primase	-	1059
DNA ligase	lig	1431
Transcription factor 1	TF1	279
Translation repressor protein	regA	465
DNA primase/helicase	4_1, 4_2, 4_3	2064, 2064, 1986
Anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase	nrdD, nrdD_1, nrdD_2, nrdD_2	855, 1200, 1200, 855
Thymidylate synthase e Thymidylate synthase 2	thyA, thyA2	1047, 900
Antirepressor protein ant	ant	903
Regulatory protein mnt	mnt	255
Terminase, large e small subunit	2, 3	1326, 489
Exonuclease	exo	525
Sliding-clamp-loader gp44 subunit	-	759
Antitermination protein Q	Q	624
GemA protein	GemA	468
Type 2 topoisomerase subunit B	gyrB	1899

Ribonuclease HI	rnhA	528
ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	clpP	912
Ribose-phosphate pyrophosphokinase	prs	801
DNA adenine methyltransferase YhdJ	yhdJ	738
Lise celular		
Lysozyme RrrD	rrrD_1, rrrD_2, rrrD_3	558, 438, 465
Lysozyme	R	558
Spanin, inner membrane subunit	Rz	468
Endolysin	-	438, 525, 465
Antiholin	-	327

As análises das sequências obtidas para o fago KPSM1 revelam vários genes codificadores de proteínas que formam a cauda, caudas complexas geralmente são características que distinguem os myovírus de outros vírus da ordem *Caudovirales* (LEIMAN *et al.*, 2010).

Os isolados SM1 e SEPL1 apresentaram nos resultados das anotações, genes relacionados à lisogenia, inclusive, SEPL1 (**Tabela 6**) apresentou um gene para a enzima integrase, sendo o único isolado no qual ela foi encontrada. Para tratamento de infecções, seja de carácter humano, animal não humano ou mesmo ambiental, tende-se a dar prioridade a vírus que não realizem o ciclo lisogênico, devido a capacidade de infectar e lisar células por esses fagos ser prejudicada pelo rápido aparecimento de imunidade de superinfecção bacteriana (BERNGRUBER, WEISSING & GANDON, 2010), além da possibilidade de transferência de elementos genéticos que podem ser prejudiciais, como por exemplo, genes que confirmam resistência ou genes de toxinas codificadas pelos fagos (ALTAMIRANO & BARR, 2019; FORTIER & SEKULOVIC, 2013; O’SULLIVAN *et al.*, 2019). As proteínas *Repressor protein C2* e *Regulatory protein cro* presentes no SM1 e SEPL1, são proteínas repressoras, as quais são importantes mediadoras da regulação negativa da transcrição do fago, ou seja, ela auxilia na manutenção do fago na sua forma integrada ao genoma do hospedeiro, sendo a proteína C2, por exemplo, essencial nesse papel que irá manter a lisogenia (SAUER *et al.*, 1981). A *Regulatory protein cro* é uma proteína importante para o controle da alteração do estado lisogênico para o estado lítico (TAKEDA, FOLKMANIS & ECHOLS, 1977).

Tabela 6 - Classificação funcional das proteínas produzidas pelos genes do fago SEPL1.

Funções	Gene	Tamanho (Bp)
Estrutura da cauda		

Tail sheath protein	-, FI	1896, 1173
Tail tube protein	-, FII_1, FII_2	534, 516, 516
Baseplate wedge protein gp25	-	381
Tail fiber assembly protein	Tfa	597, 621
Spike protein	9, V	1407, 627
Baseplate protein X	X	201, 207
Tail needle protein gp26	-	639
Peptidoglycan hydrolase gp4	4_1, 4_5	483, 401
DNA transfer protein gp7	7	690
Prophage tail fiber assembly protein TfaE	tfaE	621, 597
Estrutura do capsídeo		
Portal protein	-	1695
Major capsid protein	ORF4	1014, 1050, 1272
Head completion/stabilization protein	L	489, 456
Capsid proteins	N	1146
Capsid assembly scaffolding protein	O	846, 810
Prohead protease	4_2	651
Reguladores do ciclo replicativo viral e metabolismo do hospedeiro		
Recombination and repair protein	UVSX	1086
ATP-dependent helicase 41	-	1425
DNA-directed DNA polymerase	-	3000
ATP-dependent DNA helicase uvsW	uvsW	1509
DNA polymerase processivity component	-	669
Sliding-clamp-loader gp44 subunit	-	990
Translation repressor protein	regA	465
Transcription factor 1	TF1	279
DNA primase	-	1059
Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit	I4L	2283
Ribonucleoside-diphosphate reductase 1 subunit beta e alpha	nrdB, nrdB_1, nrdB_2, nrdA, nrdA_1, nrdA_2	1104, 1089, 1074, 2283, 2313, 2235
Methyltransferase Dmt	dmt_1, dmt_2	972, 828
Regulatory protein cox	cox_1, cox_2	282, 273
Repressor protein C	C_1, C_2	321, 294
Repressor protein C2	C2_1, C2_2	654, 678
Integrase	int	981
Regulatory protein cro	cro	186
Replication gene A protein	A	2379
Regulatory protein mnt	Mnt_1, mnt_2	255, 252
DNA endonuclease I-HmuI	-	465
Terminase, small e large subunit	3, 2	489, 1326
DNA primase/helicase	4_3, 4_4	1986, 2064
Thymidylate synthase 2	thyA2	900
DNA ligase	Lig	1431
Type 2 topoisomerase subunit B	gyrB	1899
Single-stranded DNA-binding protein	ssb	540

Ribonuclease HI	rnhA	528
Replicative DNA helicase	dnaB	1446, 1371
ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	clpP	912
DNA adenine methylase	dam_1, dam_2	972, 828
Lise celular		
Endolysin	-	465, 489, 435
L-alanyl-D-glutamate peptidase	lys	405
Spanin, inner membrane subunit	Rz	456, 351
Lysozyme	R	471
Lysozyme RrrD	rrrD_1, rrrD_2, rrrD_3	471, 465, 441

Todos os isolados apresentaram ao menos um gene para alguma endolisina. Os fagos SECF1, SEPL1, EASM1 (**Tabela 7**) e KPSM1 (**Tabela 8**) apresentaram genes para lisozimas. Para abandonar a célula hospedeira e terminar o ciclo replicativo, os fagos que infectam bactérias Gram-negativas precisam passar por três camadas, a membrana interna, a camada de peptideoglicanas e a membrana externa. As holinas são enzimas que fazem buracos na membrana citoplasmática e permitem que as endolisinas saiam do citoplasma e degradem os peptideoglicanos. Finalmente, a membrana externa é rompida por um complexo protéico chamado de *Spanin complex* (BERRY *et al.*, 2012; YOUNG, 2014). Os bacteriófagos SM1, SECF1 e SEPL1 apresentaram gene para *Spanin complex*, o qual tem como produto a subunidade da membrana interna. O isolado *S. enterica* SM1 já teve inclusive a sua capacidade lítica para redução da contaminação por *S. enterica* sorotipo Typhimurium em cama de aviário demonstrada em outro estudo realizado pelo grupo, sendo que a aplicação repetida do fago demonstrou uma redução de até 99,9% da contaminação bacteriana (ROGOVSKI *et al.*, 2021).

Apesar da abundância de dados obtidos na montagem e predição genômica, é válido ressaltar a enorme quantidade de genes que aparecem descritos como codificadores de proteínas hipotéticas, que são genes desconhecidos que foram preditos nas análises, os quais representam a maioria dos genes anotados para os vírus neste estudo. Fagos líticos podem chegar a apresentar 50% do seu genoma com genes hipotéticos (PHILIPSON *et al.*, 2018). É importante ressaltar também que todos os genes anotados que se referem a características físicas poderiam ter tais fenótipos confirmados em análises por microscopia eletrônica.

Várias informações foram adquiridas pelas análises discutidas aqui, alguns dados acabam se contradizendo, como exemplo dos genes encontrados em *Podoviridae* ao mesmo tempo em que genes para bainha foram anotados também para os mesmos isolados. Assim, os

diversos dados obtidos nas predições poderiam ser reafirmados com evidências adicionais colotadas em testes complementares, como visualização por meio de microscopia eletrônica, por exemplo. As evidências encontradas neste estudo sugerem fortemente que os vírus isolados pertencem à ordem dos vírus possuidores de cauda, grupo identificado como *Caudovirales*. Dentre os vírus que infectam bactérias, o supracitado grupo é o melhor representado com mais espécies descritas e caracterizados genômica e morfológicamente, dentro dessa ordem as famílias *Siphoviridae*, *Myoviridae* e *Podoviridae* são as maiores em quantidade de espécies, bem como de genomas sequenciados, respectivamente (ACKERMANN, 2001; DAVIDSON *et al.*, 2011; ZRELOVS, DISLERS & KAZAKS, 2020).

É relevante também destacar que existem discussões acerca do viés no isolamento de bacteriófagos, esses vieses tendem a beneficiar a identificação de fagos com genoma DNA, em especial os que possuem cauda, e em detrimento dos vírus de genoma de RNA (WANG, 2020), o que pode gerar distorções na real abundância ambiental desses vírus (KRISHNAMURTHY *et al.*, 2016).

Kauffman (2018) e sua equipe, por exemplo, relatam em seu trabalho, a identificação de uma nova família de vírus isolados de ambientes marinhos, a qual eles chamam de *Autolykiviridae*, composta de fagos de dsDNA, sem cauda que infectam bactérias da família *Vibrionaceae*. No estudo os autores relatam características nos protocolos que atuavam de forma negativa no isolamento desses vírus, um desses passos é a adição de clorofórmio, substância utilizada para remover as bactérias e manter apenas os vírus, no entanto nesse caso, os autores relatam que a utilização do reagente reduzia a capacidade infectiva dos vírus de forma que eles não eram detectáveis. Outras características dos vírus como a baixa densidade de flutuação (provavelmente relacionado à presença da bicamada lipídica) nas preparações de amostras ambientais, o que influencia em etapas que realizam separação por gradiente de densidade, bem como a necessidade do uso de proteases na extração do genoma, são características que tendem a afetar negativamente a identificação do grupo viral (KAUFFMAN *et al.*, 2018).

Tabela 7 - Classificação funcional das proteínas produzidas pelos genes do fago EASM1.

Funções	Gene	Tamanho (Bp)
Estrutura do capsídeo		
Portal protein B	B	1680
Lise celular		
Lysozyme	R	504

Lysozyme RrrD	rrrD	504
Endolysin A	-	630
Antiholin	S	225
Reguladores do ciclo replicativo viral e metabolismo do hospedeiro		
Exonuclease	exo	681
Antitermination protein Q	Q	822
DNA primase	dnaG	1746

Tabela 8 - Classificação funcional das proteínas produzidas pelos genes do fago KPSM1.

Funções	Gene	Tamanho (Bp)
Estrutura da cauda		
Tail tip protein L	L	756
Baseplate tail-tube junction protein gp54	-	966
Baseplate wedge protein gp53	-	591
Baseplate tail-tube junction protein gp48	-	1059
Baseplate hub assembly protein gp28	-	534
Baseplate central spike complex protein gp27	-	1173
Baseplate wedge protein gp25	-	399
Tail tube protein gp19	-	492
Tail sheath protein	-	1821
Tail completion protein gp15	-	819
Neck protein gp14 e 13	-	771, 930
Short tail fiber protein gp12	-	1584
Baseplate wedge protein gp11 e 10	-	660, 1809
Baseplate protein gp9	9	867
Baseplate wedge protein gp8, 7 e 6	8, 7, 6	1005, 3099, 1980
Baseplate central spike complex protein gp5	5	1773
Tail tube terminator protein	3	531
Tail fiber assembly helper protein	-	243
Long-tail fiber protein gp36 e 35	-	690,1116
Long-tail fiber proximal subunit	-	3870
Fibritin	wac	1464
Estrutura do capsídeo		
Prohead protease	4	561
Head formation protein	-	345
Capsid assembly protein Gp31	-	336
Highly immunogenic outer capsid protein	hoc	1131
Capsid vertex protein	-	1284
Major capsid protein	-	1566
Capsid assembly scaffolding protein	-	810
Prohead core protein protease	-	639
Prohead assembly protein gp68	-	426
Portal protein	-	1575

Small outer capsid protein	soc	246
Internal protein III	Ipi3	579
Reguladores do ciclo replicativo viral e metabolismo do hospedeiro		
Serine recombinase gin	Gin, Gin_1, Gin_2, Gin_3	597, 618, 264, 552
DNA gyrase subunit B e A	gyrB, gyrA	1368, 1329
Primosomal protein 1	dnaT	768
Thymidylate synthase	TD_1, TD_2, thyA_1, thyA_2	315, 552, 741, 315
Thymidylate synthase 2	thyA2	552
NAD--protein ADP-ribosyltransferase modA e modB	ModA_1, ModA_2, ModB	486, 624, 603
Sliding-clamp-loader gp44 subunit	-	459, 564
Translation repressor protein	RegA	369
DNA-directed DNA polymerase	-	2697
DNA beta-glucosyltransferase	bgt	1077
Recombination and repair protein	UVSX	1176
ATP-dependent helicase 41	-	1362
Antitoxin Dmd	dmd	183
Protein spackle	sp	294
DNA primase	-	1032
Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit	I4L	1434
Ribonucleoside-diphosphate reductase 1 subunit alpha e beta	nrdA_1, nrdA_2, nrdB_1, nrdB_2	1434, 990, 678, 480
Recombination endonuclease VII	-	474
Glutaredoxin e Glutaredoxin-like protein NrdH	nrdH	246
RNA polymerase sigma factor	-	558
DNA alpha-glucosyltransferase	agt	1203
Exonuclease subunit 1 e 2	-	1020, 1641
15 kDa RNA polymerase-binding protein	rpba	390
DNA polymerase clamp	-	687
DNA ligase	lig	1464
Thymidine kinase	tdk	582
Endonuclease II	DenA	411
T4 RNA ligase 1	-	1125
Polynucleotide kinase	pseT	903
Deoxycytidylate deaminase	CD	582
Recombination protein uvsY	uvsY	414
ATP-dependent DNA helicase uvsW	uvsW_1, uvsW_2	234, 1509
RNA ligase 2	-	1005
Terminase, large e small subunit	-	1833, 495
Deoxynucleotide monophosphate kinase	1	726
Endoribonuclease RegB	RegB	462

Valyl--tRNA ligase modifier	vs	348
DNA adenine methylase	DAM	780
ATP-dependent DNA helicase dda	dda	1320
DNA topoisomerase large subunit	-	1368
Protein rIIA	rIIA	2178
Nucleoid disruption protein	ndd	444
Anti-restriction endonuclease	arn	279
10 kDa anti-sigma factor	asiA	273
Ribonuclease H	rnh	918
Double-stranded DNA-binding protein	dsbA	270
RNA polymerase-associated protein Gp33	-	339
Single-stranded DNA-binding protein	-	906
Intron-associated endonuclease 1	ITEVIR	738
Type III restriction-modification system EcoPI enzyme mod	MOD	2028
Protein Gp59	-	654
DNA adenine methyltransferase yhdJ	yhdJ	684, 702
Anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase	nrdD	1818
Lise Celular		
Lysozyme	R	495
Lysozyme RrrD	RrrD	495
Lysis inhibition accessory protein	rIII	249
L-alanyl-D-glutamate peptidase	Lys	375
Endolysin	E	489
Holin	t	657
Antiholin	rI	294

3.5 Busca por genes de resistência a antibióticos no genoma dos fagos

Objetivando conhecer mais a fundo os isolados, buscou-se pela presença de possíveis genes de resistência microbiana nos seus genomas. Para esse fim, usou-se a linha de comando do programa CARD RGI, que usa o banco de dados CARD para predição de genes de resistência em arquivos de sequências de nucleotídeos (MCARTHUR *et al.*, 2013). A **Tabela 9** apresenta os resultados das análises de busca por genes de resistência a partir dos *reads* das amostras sequenciadas, a tabela está organizada por ordem decrescente do valor de alinhamento com a sequência referência. Estudos costumam traçar uma linha de corte para seleção das possíveis sequências codificadoras de elementos de resistência, geralmente, essa linha de corte aceita genes com 60% de cobertura da sequência analisada em relação a sequência referência no processo de alinhamento e identidade maior ou igual a 80% (LEKUNBERRI *et al.*, 2017; MOON *et al.*, 2020; SUBIRATS *et al.*, 2016).

Nas predições por CARD RGI, nas sequências do isolado KPSM1 se identificou a maior quantidade de possíveis genes de resistência, os quais pertencem às classes de genes: Macrolídeos, Lincosamida, Estreptogramina, Diaminopirimidina, Fluoroquinolona, Cefalosporina, Glicilciclinas, Cefamicina, Penem, Tetraciclina, Rifamicina, Fenicol, Triclosan, Cefamicina e Aminoglicosídeos. Amostras ditas reservatórios de genes de resistência a antibióticos (genes que podem estar presentes tanto nas bactérias quanto nos vírus que as infectam) possuem grandes cargas de contaminação bacteriana, em amostras provindas de dejetos suínos, tais elementos genéticos ali presentes, costumam codificar para proteínas da classe β -lactamase e de resistência a fluoroquinolonas (CALERO-CÁCERES, YE, BALCÁZAR, 2019; LEKUNBERRI *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2018). Estes dados vão ao encontro dos resultados obtidos neste trabalho, visto que a maior quantidade de genes de resistência foi encontrada nos isolados de amostras provindas de dejetos de suinocultura, sendo os anti- β -lactâmicos encontrados nesses isolados.

A circulação de genes de resistência aos antibióticos no ambiente é um problema tanto para os seres humanos quanto para os outros animais, visto que a transmissão destes elementos para as bactérias pode ocorrer por diferentes mecanismos, dentre os quais se destaca a transferência horizontal, no qual os fagos desempenham papel principal (WANG *et al.*, 2018). Tendo isso em vista se faz necessário tomar todos os cuidados no momento de caracterizar bacteriófagos dedicados a fagoterapia, a fim de evitar a transmissão de elementos indesejados (WEBER-DABROWSKA *et al.*, 2016).

Tabela 9 - Genes de resistência encontrados na análise por CARD RGI.

Isolado	Termo ARO	Critério de detecção	Família do gene	Classe da droga	Mecanismo de resistência	% Identidade da região correspondente	% Tamanho da Sequência de Referência (Bp)
KPSM1	Erm (41)	Modelo homólogo de proteína	Erm 23S ribosomal RNA methyltransferase	Macrolídeos, Lincosamida, Estreptogramina	Alteração do alvo do antibiótico	38,57	135,51
SECF1 e SEPL1	dfrE	Modelo homólogo de proteína	Trimethoprim resistant dihydrofolate reductase dfr	Diaminopirimidina	Realocação do alvo do antibiótico	33,33	110,37
KPSM1	dfrA9	Modelo homólogo	Trimethoprim resistant	Diaminopirimidina	Realocação do alvo	29,82	109,04

		o de proteína	dihydrofolate reductase dfr		do antibiótico		
SM1	mdtB	Modelo homólogo de proteína	Resistance-nodulation-cell division (RND) antibiotic efflux pump	aminocoumarina	Efluxo de antibiótico	25,64	103,17
SM1	bcr-1	Modelo homólogo de proteína	Major facilitator superfamily (MFS) antibiotic efflux pump	Biciclomicina	Efluxo de antibiótico	38,26	100,00
KPSM1	<i>Clostridioides difficile</i> gyrB conferring resistance to fluoroquinolones	Modelo de proteína variante	Fluoroquinolona e resistant gyrB	Fluoroquinolona	Alteração do alvo do antibiótico	24,91	99,22
KPSM1	AcrS	Modelo homólogo de proteína	Resistance-nodulation-cell division (RND) antibiotic efflux pump	Fluoroquinolona, Cefalosporina, Gliciliclinas, Cefamicina, Penem, Tetraciclina, Rifamicina, Fenicol, Triclosan	Efluxo de antibiótico	53,54	98,64
KPSM1	acrE	Modelo homólogo de proteína	Resistance-nodulation-cell division (RND) antibiotic efflux pump	Fluoroquinolona, Cefalosporina, Cefamicina, Penem	Efluxo de antibiótico	75,53	98,44
SEPL1	<i>Escherichia coli</i> fabI mutations conferring resistance to isoniazid and triclosan	Modelo de proteína variante	Antibiotic resistant fabI	Isoniazida, Triclosan	Alteração do alvo do antibiótico	27,06	95,80
SM1	evgA	Modelo homólogo de proteína	Major facilitator superfamily (MFS) antibiotic efflux pump, resistance-nodulation-cell	Macrolídeos, Fluoroquinolona, Penem, Tetraciclina	Efluxo de antibiótico	26,52	95,10

			division (RND) antibiotic efflux pump				
KPSM1	oleI	Modelo homólogo de proteína	Ole glycosyltransferase	Macrolídeos	Inativação de antibiótico	30,0	92,22
SM1	CAU-1	Modelo homólogo de proteína	CAU beta-lactamase	Carbapenêmicos, Penem	Inativação de antibiótico	27,78	88,24
KPSM1, SECF1 e SEPL1	<i>Clostridioides difficile</i> gyrB conferring resistance to fluoroquinolones.	Modelo de proteína variante	Fluoroquinolone e resistant gyrB	Fluoroquinolona	Alteração do alvo do antibiótico	29,13	71,43
KPSM1	<i>Mycoplasma genitalium</i> parC mutations confers resistance to Moxifloxacin	Modelo de proteína variante	Fluoroquinolone e resistant parC	Fluoroquinolona	Alteração do alvo do antibiótico	24,89	56,59
SEPL1	<i>Salmonella enterica</i> gyrA conferring resistance to fluoroquinolones	Modelo de proteína variante	Fluoroquinolone e resistant gyrA	Fluoroquinolona	Alteração do alvo do antibiótico	27,78	50,46
SM1	macB	Modelo de proteína variante	ATP-binding cassette (ABC) antibiotic efflux pump	Macrolídeo	Efluxo de antibiótico	34,3	36,65
KPSM1	AAC(6')-Ib8	Modelo homólogo de proteína	AAC (6')	Aminoglicosídeo	Inativação de antibiótico	80,0	18,67
KPSM1	AcrF	Modelo de proteína variante	Resistance-nodulation-cell division (RND) antibiotic efflux pump	Fluoroquinolona, Cefalosporina, Cefamicina, Penem	Efluxo de antibiótico	81,03	6,09

4 CONCLUSÃO

- Foram isolados 5 bacteriófagos, 3 destes possuem capacidade de infectar *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, 1 infectou *Enterobacter aerogenes* e outro *Klebsiella pneumoniae*;
- Os resultados da montagem genômica sugerem que todos os bacteriófagos isolados pertencem à ordem *Caudovirales*, famílias *Siphoviridae* e *Myoviridae*.
- Um gene codificador de integrase foi anotado para o fago SEPL1, o que restringe a utilização desse fago para fins líticos, uma vez que possui putativa capacidade integrativa em genoma bacteriano;
- As análises via CARD RGI identificaram diversos possíveis genes de resistência com diferentes valores de identidade e cobertura em relação às sequências dos isolados. O gene *acrE* apresentou similaridade com as sequências dos bacteriófagos, acima da linha de corte utilizada na literatura.

Em suma, os isolados com capacidade lítica, que não demonstraram elementos de resistência, nem genes codificadores de proteínas controladoras do ciclo lisogênico, sendo os isolados *Salmonella enterica phage* SM1 e *Salmonella enterica phage* SECF1 os melhores candidatos com essas características, para o uso no controle de enterobactérias da pecuária brasileira. Para isso, a realização de estudos que busquem ampliar a caracterização e entender o comportamento dos vírus isolados neste trabalho, quando aplicados em situações diversas, aliado a caracterização realizada e relatada nesta monografia, servem de base para a formulação de um possível coquetel bacteriológico para aplicações específicas.

5 REFERÊNCIAS

- ABEDON, S. T. Use of phage therapy to treat long-standing, persistent, or chronic bacterial infections. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.L.], v. 145, p. 18-39, maio 2019.
- ACKERMANN H.W. Tailed bacteriophages: the order Caudovirales. **Advances in Virus Research**. 51. pp. 135–201, 1998.
- ACKERMANN, H. W. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. **Brief review**. *Archives of Virology*, v. 146, n. 5, p. 843–857, 2001.
- ACKERMANN, H.W. 5500 Phages examined in the electron microscope. **Archives of Virology**, v. 152, p. 227-43. 2007.
- ACKERMANN, H.W. Phage classification and characterization. **Methods Mol. Biol.** 501, 127–140, 2009.
- ACKERMANN, H.W. .; PRANGISHVILI, D. Prokaryote viruses studied by electron microscopy. **Archives of Virology**, v. 157, n. 10, p. 1843–1849, 3 jul. 2012.
- ADAMS, M. H. Bacteriophages. New York: **Interscience Publishers, Inc.**; 1959.
- ADRIAENSSENS, E.; BRISTER, J. R. How to Name and Classify Your Phage: An Informal Guide. **Viruses**, v. 9, n. 4, p. 70, 3 abr. 2017.
- ANDREWS-PFANNKOCH, C. *et al.* Hydroxyapatite-Mediated Separation of Double-Stranded DNA, Single-Stranded DNA, and RNA Genomes from Natural Viral Assemblages. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 76, n. 15, p.5039-5045, 2010.
- ALMPANIS, A. et al. Correlation between bacterial G+C content, genome size and the G+C content of associated plasmids and bacteriophages. **Microbial Genomics**, v. 4, n. 4, 10 abr. 2018.
- ALTAMIRANO, F. L. G.; BARR, J. J.. Phage Therapy in the Postantibiotic Era. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 32, n. 2, p. 1-25, 20 mar. 2019.
- AZEVEDO, P. A. A. *et al.* Molecular characterisation of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* belonging to CC258 isolated from outpatients with urinary tract infection in Brazil. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 18, p. 74–79, set. 2019.
- BERNGRUBER, T. W.; WEISSING, F. J.; GANDON, S. Inhibition of Superinfection and the Evolution of Viral Latency. **Journal of Virology**, v. 84, n. 19, p. 10200–10208, 21 jul. 2010.
- BERRY, J. et al. The Spanin Complex Is Essential for Lambda Lysis. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 20, p. 5667–5674, 15 out. 2012.
- BOYEN, F., *et al.* Non-typhoidal *Salmonella* infections in pigs: A closer look at epidemiology, pathogenesis and control. **Veterinary Microbiology**. Vol. 130, p. 1-19, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. 2010. Disponível

em:

http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_vigilancia_doencas_alimentos.pdf >. Acesso em: 11 set. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis, Coordenação-Geral de Vigilância de Zoonoses e Doenças de Transmissão Vetorial. **Surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar no Brasil**. 2022. Disponível em: < <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/arquivos/doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-dtha/apresentacao-surtos-dtha-2022.pdf/view> >. Acesso em: 23 fev. 2022.

BRIDIER, A., *et al.* Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. **Food microbiology**, v. 45, p. 167-178, 2015.

BRIERS, Y. Phage Lytic Enzymes. **Viruses**, v. 11, n. 2, p. 113, 29 jan. 2019.

BRÜSSOW, H.; CANCHAYA, C.; HARDT, W-D. Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, [S.L.], v. 68, n. 3, p. 560-602, set. 2004.

BYL, C. V.; KROPINSKI, A. M. Sequence of the Genome of Salmonella Bacteriophage P22. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 22, p. 6472–6481, 15 nov. 2000.

CALERO-CÁCERES, W.; YE, M.; BALCÁZAR, J. L. Bacteriophages as Environmental Reservoirs of Antibiotic Resistance. **Trends in Microbiology**, v. 27, n. 7, p. 570–577, jul. 2019.

CHAN, B. K. *et al.* Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1-8, 26 maio 2016.

CHIBANI, C. M.; FARR, A.; KLAMA, S.; DIETRICH, S.; LIESEGANG, H. Classifying the Unclassified: a phage classification method. **Viruses**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 1-15, 24 fev. 2019.

CLAVIJO, V. *et al.* Phage cocktail SalmoFREE® reduces *Salmonella* on a commercial broiler farm. **Poultry Science**, v. 98, n. 10, p. 5054–5063, out. 2019.

CURTIN, J. J.; DONLAN, R. M.. Using Bacteriophages To Reduce Formation of Catheter-Associated Biofilms by *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 50, n. 4, p. 1268-1275, abr. 2006.

CZAPLEWSKI, L. *et al.* Alternatives to antibiotics—a pipeline portfolio review. **The Lancet Infectious Diseases**, [s.l.], v. 16, n. 2, p.239-251, 2016.

DAVIDSON, A. R. *et al.* Long Noncontractile Tail Machines of Bacteriophages. **Viral Molecular Machines**, p. 115–142, 8 nov. 2011.

DAVIN-REGLI A.; PAGÈS J. M. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. v. 6, p. 1-10. **Front. Microbiol.**, 18 May 2015.

DION, M. B.; OECHSLIN, F.; MOINEAU, S. Phage diversity, genomics and phylogeny. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 18, n. 3, p. 125-138, 3 fev. 2020.

- DONG, D. *et al.* Survey and rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* in clinical samples targeting the *rcaA* gene in Beijing, China. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 22 maio 2015.
- DONLAN, R. M. Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. **Trends In Microbiology**, [S.L.], v. 17, n. 2, p. 66-72, fev. 2009.
- DRULIS-KAWA, Z.; MAJKOWSKA-SKROBEK, G.; MACIEJEWSKA, B. Bacteriophages and Phage-Derived Proteins – Application Approaches. **Current Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 22, n. 14, p. 1757-1773, 24 abr. 2015.
- EDGAR, R.; FRIEDMAN, N.; MOLSHANSKI-MOR, S.; QIMRON, U. Reversing Bacterial Resistance to Antibiotics by Phage-Mediated Delivery of Dominant Sensitive Genes. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 78, n. 3, p. 744-751, 23 nov. 2011.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Escherichia coli K-12 Derivatives Final Risk Assessment**. 1997. Disponível em: < <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/fra004.pdf>>. Acesso em: 10 set. 2019.
- FOKINE, A.; ROSSMANN, M. G. Molecular architecture of tailed double-stranded DNA phages. **Bacteriophage**, [S.L.], v. 4, n. 2, p. 1-22, 21 fev. 2014.
- FORTIER, L.-C.; SEKULOVIC, O. Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. **Virulence**, v. 4, n. 5, p. 354–365, jul. 2013.
- GONZÁLEZ-MENÉNDEZ, E. *et al.* Comparative analysis of different preservation techniques for the storage of *Staphylococcus* phages aimed for the industrial development of phage-based antimicrobial products. **Plos One**, [s.l.], v. 13, n. 10, p.1-14, 2018.
- GREGORACCI, G. B. **Levantamento De Bacteriófagos Líticos: Isolamento E Caracterização De Vírus Provenientes De Esgoto Comum Com Potencial Aplicação Antimicrobiana**. 101 f. Tese (mestrado) - Curso de Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- GUENTZEL, M. N. *Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter, and Proteus*. In: Baron S, editor. **Medical Microbiology**. 4ª edição. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Cap. 26. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8035/>>. Acesso em: 18 set. 2019.
- GUTIÉRREZ, D.; VANDENHEUVEL, D.; MARTÍNEZ, B.; RODRÍGUEZ, A.; LAVIGNE, R.; GARCÍA, P. Two Phages, phiIPLA-RODI and phiIPLA-C1C, Lyse Mono- and Dual-Species *Staphylococcal* Biofilms. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 81, n. 10, p. 3336-3348, 15 maio 2015.
- HAABER, J. *et al.* Bacterial viruses enable their host to acquire antibiotic resistance genes from neighbouring cells. **Nature Communications**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-8, 7 nov. 2016.
- HARPER, D. *et al.* Bacteriophages and Biofilms. **Antibiotics**, [S.L.], v. 3, n. 3, p. 270-284, 25 jun. 2014.
- HU, B.; MARGOLIN, W.; MOLINEUX, I. J.; LIU, J. Structural remodeling of bacteriophage T4 and host membranes during infection initiation. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 112, n. 35, p. 4919-4928, 17 ago. 2015.

HUNGARO, M. H., *et al.* Use of bacteriophages to reduce *Salmonella* in chicken skin in comparison with chemical agents. **Food Research International**. Vol. 52, Issue 1, p. 75-81, 2013.

ICTV, Master Species List 2020.v1, 2020. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/m/msl/12314>>.

JOŃCZYK, E. *et al.* The influence of external factors on bacteriophages—review. **Folia Microbiologica**, v. 56, n. 3, p. 191–200, maio 2011.

JONES, B. T. *et al.* Complete Genome Sequence of *Proteus mirabilis* Phage Mydo. **Microbiology Resource Announcements**, v. 8, n. 47, 21 nov. 2019.

JONGE, P. A.; NOBREGA, F. L.; BROUNS, S. J. J.; DUTILH, B. E. Molecular and Evolutionary Determinants of Bacteriophage Host Range. **Trends In Microbiology**, [S.L.], v. 27, n. 1, p. 51-63, jan. 2019.

KASMAN L. M., PORTER L. D. **Bacteriophages**. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 Jan-. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493185/>>. Acesso em: 18 set. 2019.

KAUFFMAN, K. M. *et al.* A major lineage of non-tailed dsDNA viruses as unrecognized killers of marine bacteria. **Nature**, v. 554, n. 7690, p. 118–122, 24 jan. 2018.

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

KING, A. M. Q., *et al.* Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. **Elsevier**, 2011.

KRISHNAMURTHY, S. R. *et al.* Hyperexpansion of RNA Bacteriophage Diversity. **PLOS Biology**, v. 14, n. 3, p. e1002409, 24 mar. 2016.

LABUDDA, Ł. *et al.* Complete Annotated Genome Sequences of Four *Klebsiella pneumoniae* Phages Isolated from Sewage in Poland. **Genome Announcements**, v. 5, n. 45, 9 nov. 2017.

LARRAÑAGA, O. *et al.* Phage particles harboring antibiotic resistance genes in fresh-cut vegetables and agricultural soil. **Environment International**, v. 115, p. 133–141, 1 jun. 2018.

LEAVITT, J. C. *et al.* The Tip of the Tail Needle Affects the Rate of DNA Delivery by Bacteriophage P22. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e70936, 12 ago. 2013.

LEHMAN, S. M.; DONLAN, R. M.. Bacteriophage-Mediated Control of a Two-Species Biofilm Formed by Microorganisms Causing Catheter-Associated Urinary Tract Infections in an In Vitro Urinary Catheter Model. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 59, n. 2, p. 1127-1137, 8 dez. 2014.

LEIMAN, P. G. *et al.* Morphogenesis of the T4 tail and tail fibers. **Virology Journal**, v. 7, n. 1, dez. 2010.

- LEKUNBERRI, I. et al. Exploring the contribution of bacteriophages to antibiotic resistance. **Environmental Pollution**, v. 220, p. 981–984, jan. 2017.
- LI, H. F.; WANG, X. F.; TANG, H. Predicting Bacteriophage Enzymes and Hydrolases by Using Combined Features. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 24 mar. 2020.
- LIU, D., *et al.* The Safety and Toxicity of Phage Therapy: a review of animal and clinical studies. **Viruses**, [S.L.], v. 13, n. 7, p. 1-20, 29 jun. 2021.
- MARKINE-GORIAYNOFF, N., *et al.* Glycosyltransferases encoded by viruses. **Journal Of General Virology**, [S.L.], v. 85, n. 10, p. 2741-2754, 1 out. 2004.
- MCARTHUR, A. G., *et al.* The Comprehensive Antibiotic Resistance Database. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 57, n. 7, p. 3348-3357, 6 maio 2013.
- MELO, L. D. R. *et al.* Development of a Phage Cocktail to Control *Proteus mirabilis* Catheter-associated Urinary Tract Infections. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 7, p. 1-12, 28 jun. 2016
- MILLER, E. S. *et al.* Bacteriophage T4 Genome. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 1, p. 86–156, 1 mar. 2003.
- MOAK, M.; MOLINEUX, I. J. Peptidoglycan hydrolytic activities associated with bacteriophage virions. **Molecular Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 1169–1183, 23 dez. 2003.
- MOON, K. et al. Freshwater viral metagenome reveals novel and functional phage-borne antibiotic resistance genes. **Microbiome**, v. 8, n. 1, 1 jun. 2020.
- NOBREGA, F. L. *et al.* Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 16, n. 12, p. 760-773, 13 ago. 2018.
- OLIA, A. S. et al. Binding-induced Stabilization and Assembly of the Phage P22 Tail Accessory Factor Gp4. **Journal of Molecular Biology**, v. 363, n. 2, p. 558–576, out. 2006.
- O’SULLIVAN, L. et al. Bacteriophages in Food Applications: From Foe to Friend. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 10, n. 1, p. 151–172, 25 mar. 2019.
- OTTOSSON, J.; STENSTROM, T. A. Growth and reduction of microorganisms in sediments collected from a greywater treatment system. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 168–172, mar. 2003.
- PHILIPSON, C. W. et al. Characterizing Phage Genomes for Therapeutic Applications. **Viruses**, v. 10, n. 4, 10 abr. 2018.
- PHOTHAWORN, P. et al. Characterization of Flagellotropic, Chi-Like *Salmonella* Phages Isolated from Thai Poultry Farms. **Viruses**, v. 11, n. 6, p. 520, 5 jun. 2019.
- PRINCIPI, N.; SILVESTRI, E.; ESPOSITO, S. Advantages and Limitations of Bacteriophages for the Treatment of Bacterial Infections. **Frontiers In Pharmacology**, [S.L.], v. 10, p. 1-9, 8 maio 2019.

- ROGOVSKI, P. et al. Salmonella enterica Serovar Enteritidis Control in Poultry Litter Mediated by Lytic Bacteriophage Isolated from Swine Manure. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 16, p. 8862, 23 ago. 2021.
- ROHWER, F., PRANGISHVILI, D., LINDELL, D. Roles of viruses in the environment. **Environmental Microbiology**. 11:2771–2774. 2009.
- SALMOND, G. P. C., FINERAN, P. C. A century of the phage: past, present and future. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 13, n. 12, p. 777-786, 9 nov. 2015.
- SAUER, R. T. et al. Primary structure of the phage P22 repressor and its gene c2. **Biochemistry**, v. 20, n. 12, p. 3591–3598, 9 jun. 1981.
- SCHMELCHER, M.; LOESSNER, M. J. Application of bacteriophages for detection of foodborne pathogens. **Bacteriophage**, [S.L.], v. 4, n. 2, p. 1-14, 7 fev. 2014.
- SEEMANN, T.. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, [S.L.], v. 30, n. 14, p. 2068-2069, 18 mar. 2014.
- SEGOVIA, C. et al. Complete Genome Sequence of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Bacteriophage f18SE, Isolated in Chile. **Genome Announcements**, v. 3, n. 5, 8 out. 2015.
- SHAN, J. et al. Temperature dependent bacteriophages of a tropical bacterial pathogen. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 14 nov. 2014.
- SHARMA, M. et al. Effectiveness of Bacteriophages in Reducing Escherichia coli O157:H7 on Fresh-Cut Cantaloupes and Lettuce†. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 7, p. 1481–1485, 1 jul. 2009.
- SILVA, J. B.; STORMS, Z.; SAUVAGEAU, D. Host receptors for bacteriophage adsorption. **Fems Microbiology Letters**, [S.L.], v. 363, n. 4, p. 1-11, 10 jan. 2016.
- SUBIRATS, J. et al. Metagenomic analysis reveals that bacteriophages are reservoirs of antibiotic resistance genes. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 2, p. 163–167, ago. 2016.
- TAKEDA, Y.; FOLKMANIS, A.; ECHOLS, H. Cro regulatory protein specified by bacteriophage lambda. Structure, DNA-binding, and repression of RNA synthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 252, n. 17, p. 6177–6183, set. 1977.
- THUNG, T. Y. et al. Evaluation of a lytic bacteriophage for bio-control of Salmonella Typhimurium in different food matrices. **LWT**, 105, 211-214, 2019.
- TSUTSUI, A. et al. Automated detection of outbreaks of antimicrobial-resistant bacteria in Japan. **The Journal of hospital infection**, v. 102, n. 2, p. 226–233, 1 jun. 2019.
- UNITED STATES. United States Department Of Agriculture. Foreign Agricultural Service. **Livestock and Poultry: World Markets and Trade**. 2019. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf>. Acesso em: 1 dez. 2019.

VIGRE, H., *et al.* The effect of discontinued use of antimicrobial growth promoters on the risk of therapeutic antibiotic treatment in Danish farrow-to-finish pig farms. **Epidemiol Infect.** Vol. 136, p. 92-107, 2008.

VILSKER, M., *et al.* Genome Detective: an automated system for virus identification from high-throughput sequencing data. **Bioinformatics**, [S.L.], v. 35, n. 5, p. 871-873, 16 ago. 2018.

WALDOR, M. K.; MEKALANOS, J. J.. Lysogenic Conversion by a Filamentous Phage Encoding Cholera Toxin. **Science**, [S.L.], v. 272, n. 5270, p. 1910-1914, 28 jun. 1996.

WANG, D. 5 challenges in understanding the role of the virome in health and disease. **PLOS Pathogens**, v. 16, n. 3, p. e1008318, 26 mar. 2020.

WANG, M. *et al.* Estimating the contribution of bacteriophage to the dissemination of antibiotic resistance genes in pig feces. **Environmental Pollution**, v. 238, p. 291–298, jul. 2018.

WEBER-DĄBROWSKA, B. *et al.* Bacteriophage Procurement for Therapeutic Purposes. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 12 ago. 2016.

WILLIAMSON, K. E.; HELTON, R. R.; WOMMACK, K. E. Bias in bacteriophage morphological classification by transmission electron microscopy due to breakage or loss of tail structures. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, n. 4, p. 452–457, 14 set. 2011.

WITHEY, S.; CARTMELL, E.; AVERY, L.M.; STEPHENSON, T.. Bacteriophages—potential for application in wastewater treatment processes. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 339, n. 1-3, p. 1-18, mar. 2005.

WÓJCIK, E. A. *et al.* Comprehensive Evaluation of the Safety and Efficacy of BAFASAL® Bacteriophage Preparation for the Reduction of Salmonella in the Food Chain. **Viruses**, v. 12, n. 7, p. 742, 10 jul. 2020.

YUAN, Y.; GAO, M. Jumbo Bacteriophages: An Overview. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 14 mar. 2017.

YACOBY, I; BAR, H.; BENHAR, I. Targeted Drug-Carrying Bacteriophages as Antibacterial Nanomedicines. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 51, n. 6, p. 2156-2163, jun. 2007.

YOUNG, R. Phage lysis: Three steps, three choices, one outcome. **Journal of Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 243–258, mar. 2014.

ZRELOVS, N.; DISLERS, A.; KAZAKS, A. Motley Crew: Overview of the Currently Available Phage Diversity. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 29 out. 2020.

6 APÊNDICE

6.1 PRODUÇÕES ACADÊMICAS E PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS

Artigos publicados em periódicos

ROGOVSKI, P.; **SILVA, R.**; CADAMURO, R.D.; SOUZA, E. B.; SAVI, B. P.; VIANCELLI, A.; MICHELON, W.; TÁPPARO, D. C.; TREICHEL, H.; RODRÍGUEZ-LAZARO, D.; FONGARO, G. *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Control in Poultry Litter Mediated by Lytic Bacteriophage Isolated from Swine Manure. **International Journal of Environmental Research and Public Health** **JCR**, v. 18, p. 8862, 2021.

ROGOVSKI, P.; CADAMURO, R. D.; **SILVA, R.**; SOUZA, E. B.; BONATTO, C.; VIANCELLI, A.; MICHELON, W.; ELMAHDY, E. M.; TREICHEL, H.; RODRIGUEZ-LAZARO, D.; FONGARO, G. Uses of Bacteriophages as Bacterial Control Tools and Environmental Safety Indicators. **Frontiers in Microbiology** **JCR**, v. 12, p. 1-11, 2021.

SOUZA, D. S. M.; TÁPPARO, D. C.; ROGOVSKI, P.; CADAMURO, R. D.; SOUZA, E. B.; **SILVA, R.**; DEGENHARDT, R.; LINDNER, J. D.; VIANCELLI, A.; MICHELON, W.; KUNZ, A.; TREICHEL, H.; HERNÁNDEZ, M.; RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; FONGARO, G. Hepatitis E Virus in Manure and Its Removal by Psychrophilic anaerobic Biodigestion in Intensive Production Farms, Santa Catarina, Brazil, 2018-2019. **Microorganisms** **JCR**, v. 8, p. 2045, 2020.

Capítulos de livros publicados

SOUZA, E. B.; **SILVA, R.**; SAVI, B. P.; ROGOVSKI, P.; SILVA, V. C.; ZUCHI, I. D. P.; SOUZA, D. S. M.; SILVA, I. T.; CRUZ, A. C. C.; TREICHEL, H.; FONGARO, G. Active Control of Environmental Enteric Viruses and Bacteria Using Biochar. In: Thapar Kapoor R., Treichel H., Shah M.P. (Org.). *Biochar and its Application in Bioremediation*. 1ed.Singapore: **Springer**, 2022, v. 1, p. 427-454.

ROGOVSKI, P.; CADAMURO, R. D.; SOUZA, D. S. M.; SOUZA, E. B.; **SILVA, R.**; ALVES, M. S.; VIANCELLI, A.; MICHELON, W. ; CAMARGO, A. F.; BONATTO, C.; STENFANSKI, F. S.; SCAPINI, T.; RODRIGUEZ-LAZARO, D.; TREICHEL, H.; FONGARO, G. Perspectives of biological bacteriophage-based tools for wastewater systems

monitoring and sanitary control. In: Maulin P. Shah; Susana Rodriguez-Couto; Kavita Mehta. (Org.). *The Future of Effluent Treatment Plants: Biological Treatment Systems*. 1ed.: Elsevier, 2021, v. , p. 1-775.

CADAMURO, R. D.; ROGOVSKI, P.; BONATTO, C.; SOUZA, E. B.; SILVA, R.; ALVES, M. S.; SOUZA, D. S. M.; MICHELON, W.; VIANCELLI, A.; LANNA, M. C. S.; TREICHEL, H.; FONGARO, G. A saúde da água mediada pela redução de contaminantes do ambiente aquático e recirculação Hídrica. In: Jairo Marchesan; Letícia Paludo Vargas; Maria Luiza Milani. (Org.). *Água para o desenvolvimento regional*. 1ed. São Paulo: **Liber Ars**, 2020, v. 1, p. 11-36.

Resumos publicados em anais de congressos científicos

SOUZA, D. S. M.; SILVA, V. C.; ALVES, M. S.; LANZZARIN, P. K.; DAMO, A. C. M.; ROGOVSKI, P.; CADAMURO, R. D.; SILVA, R.; SOUZA, E. B.; MIOTTO, M.; FONGARO, G.; LINDNER, J. D. Viral and bacterial decay in oyster tissues undergo to relaying post-harvest treatment in Brazil: a preliminary study. In: **Congresso Brasileiro de Virologia, 2020**. Congresso Brasileiro de Virologia, 2020.

CADAMURO, R. D.; ROGOVSKI, P.; SILVA, R.; SOUZA, E. B.; ALVES, M. S.; VIANCELLI, A.; MICHELON, W.; FONSECA, T. G.; MASS, A. P.; KROHN, D. M. A.; PETER, N. R. W.; SCHNEIDER, T. M.; FONGARO, G. Freshwater Environments Above The Guarani Aquifer. In: **Congresso Brasileiro de Virologia, 2020**. Congresso Brasileiro de Virologia, 2020.

LANNA, M. C. S.; SAVI, B. P.; SARAVIA, E. G. T.; MORAES, R. A.; SANTANNA, I. H.; PEREIRA, J. V. F.; SANTOS NETO, E. R.; RODRIGUES, I. H.; SILVA, M. H. M.; ROGOVSKI, P.; SILVA, R.; ZUCHI, I. D. P.; SOUZA, D. S. M.; SILVA, I. T.; FONGARO, G. Environmental Surveillance Of Sars-Cov-2 In Vulnerable Areas During The Peak Of The Covid-19 Pandemic In Brazil. In: **Congresso Brasileiro de Virologia, 2020**. Congresso Brasileiro de Virologia, 2020.

SOUZA, E. B.; CADAMURO, R. D.; SILVA, R.; ROGOVSKI, P.; SOUZA, D. S. M.; ALVES, M. S.; LANNA, M. C. S.; VIANCELLI, A.; MICHELON, W.; FONGARO, G. Viruses And Bacteria Adsorption From Swine Wastewater Using *Moringa oleifera* Seed

Shell. In: **Congresso Brasileiro de Virologia, 2019**, Cuiába. Congresso Brasileiro de Virologia, 2019.

CADAMURO, R. D.; ROGOVSKI, P.; **SILVA, R.**; SOUZA, E. B.; SOUZA, D. S. M.; ALVES, M. S.; VIANCELLI, A.; LANNA, M. C. S.; MICHELON, W.; FONGARO, G. Bacteriophages Isolation Against *Klebsiella pneumoniae* And *Proteus mirabilis* For Environmental Application. In: **Congresso Brasileiro de Virologia, 2019**, Cuiába. Congresso Brasileiro de Virologia, 2019.

ROGOVSKI, P.; **SILVA, R.**; CADAMURO, R. D.; SOUZA, E. B.; ALVES, M. S.; SOUZA, D. S. M.; LANNA, M. C. S.; MICHELON, W.; VIANCELLI, A.; FONGARO, G. Prospection Of New *Enterobacter aerogenes* Bacteriophages For Bacteria Control Purposes. In: **Congresso Brasileiro de Virologia, 2019**, Cuiába. Congresso Brasileiro de Virologia, 2019.

SILVA, R.; BENETTI FILHO, V.; CADAMURO, R. D.; ROGOVSKI, P.; SOUZA, E. B.; SOUZA, D. S. M.; WAGNER, G.; FONGARO, G. Brazilian Cattle Bacteriophages Isolation And Genomic Characterization. 2021. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

SILVA, R.; PAVI, C. P.; ZUCHI, I. D. P.; SAVI, B. P.; SOUZA, E. B.; CADAMURO, R. D.; ROGOVSKI, P.; SILVA, V. C.; GUTERRES, I. Z.; REIS, J. G.; SILVA, S. S. F.; SOUZA, D. S. M.; CRUZ, A. C. C.; SILVA, I. T.; FONGARO, G. Virall Brazil: Brazilian Virology Network Focused On One Health Approach. 2020. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

SILVA, R.; ROGOVSKI, P.; CADAMURO, R. D.; SOUZA, E. B.; ALVES, M. S.; SOUZA, D. S. M.; LANNA, M. C. S.; MICHELON, W.; VIANCELLI, A.; FONGARO, G. Brazilian Cattle Bacteriophages Isolation. 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Redes sociais, websites e blogs

SILVA, R.; FONGARO, G.; PAVI, C. P.; SOUZA, E. B.; CADAMURO, R. D.; ROGOVSKI, P.; SAVI, B. P.; ZUCHI, I. D. P. Rede Virall Brasil. 2020; Tema: Rede de virologia nacional. (Site). Disponível em: <<https://redevirall.wordpress.com/>>.

Cursos de curta duração ministrados

SILVA, R.; CADAMURO, R. D.; SAVI, B. P.; SILVA, V. C.; PADILHA, D. A.; PAVI, C. P.; SOUZA, E. B.; FONGARO, G. *Virologia aplicada à saúde única*. 2021. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).

SILVA, R.; SOUZA, E. B.; ZUCHI, I. D. P.; CADAMURO, R. D.; ROGOVSKI, P.; FONGARO, G. *Biologia e Biotecnologia Viral*. 2019. (Curso de curta duração ministrado/Outra).

Capítulo a ser publicado

BACTERIOPHAGES DISCOVERY AND APPLICATION FOR ENVIRONMENTAL PURPOSE

Raphael da Silva¹, Mariana Elois¹, Beatriz Pereira Savi¹, Estevão Brasiliense de Souza¹, Rafael Dorighello Cadamuro¹, Doris Sobral Marques Souza¹, David Rodríguez-Lázaro², Gislaine Fongaro¹.

¹Laboratory of Applied Virology, Federal University of Santa Catarina, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Santa Catarina State, Brazil.

²Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, 47071 Valladolid, Spain

Abstract: Bacteriophages have been known for over a century, its application for the treatment of animal infections, known as phage therapy, was also suggested by one of its discoverers, Félix d’Herelle, in the first half of the twentieth century. About the late 40’s the study on phage therapy declined due to the discovery and widespread use of the antibiotics, but in some regions, specially in Georgia, at the time part of the territory of the Soviet Union, its study continued. Currently, several bacteriophage applications have already been suggested, as a treatment for humans, animals and environmental infections, as an agent against biofilms, antibiotic delivery and many more. For the treatment of infections, both in the environment and in organisms themselves, the use of cocktails containing several species of bacteriophages tends to be the most promising. This chapter will introduce to the reader the bacteriophages, the history of its discovery and early studies, main characteristics and their diversity, as well as approach the state of the art in research using bacteriophages in different environments, highlighting their advantages and limitations.