

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

MARYORIS ELISA SOTO LOPEZ

**CARACTERIZAÇÃO DO BACTERÍOFAGO UFV-AREG1: POTENCIAL PARA O
BIOCONTROLE DE *Escherichia coli* O157:H7**

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

MARYORIS ELISA SOTO LOPEZ

**CARACTERIZAÇÃO DO BACTERÍOFAGO UFV-AREG1: POTENCIAL PARA O
BIOCONTROLE DE *Escherichia coli* O157:H7**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S718c
2018 Soto Lopez, Maryoris Elisa, 1986-
Caracterização do bacteriófago UFV-AREG1 : potencial
para o biocontrole de *Escherichia coli* O157:H7 / Maryoris Elisa
Soto Lopez. – Viçosa, MG, 2018.
xiii, 75 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Texto em português e inglês.

Orientador: Regina Célia Santos Mendonça.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Bacteriófagos. 2. Genoma. 3. Myoviridae.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia
de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 579.26

MARYORIS ELISA SOTO LOPEZ

**CARACTERIZAÇÃO DO BACTERIOFAGO UFV-AREG1: POTENCIAL PARA O
BIOCONTROLE DE *Escherichia coli* O157:H7**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 30 de janeiro de 2018.

Denise Mara Soares Bazzolli
(Coorientadora)

Humberto Moreira Hungaro

Mateus Ferreira Santana

Roberto Sousa Dias

Monique Renon Eller
(Presidente)

*A mi **Juanto**, amor de mi vida*

DEDICO

“La ciencia ha eliminado las distancias, pregonaba Melquiades! Dentro de poco, el hombre podrá ver lo que ocurre en cualquier lugar de la tierra sin moverse de su casa (antes de 1967, probablemente)...”

(Gabriel García Márquez, Cien años de soledad)

AGRADECIMENTOS

A Deus, quem desenha o caminho para todas as minhas conquistas. Sempre tive Fé.

Ao meu pequeno grande amor, Juan Antônio, você é minha fonte de inspiração e meu maior motivo. Te amo.

Ao Juan Camilo por ser meu porto seguro, quem segurou minha mão nos piores momentos e quem me abraçou quando menos o mereci. Essa conquista também é sua...

A minha mãe pelo carinho, apoio incondicional e compreensão em cada momento da minha vida.

Aos avôs do meu Juanto: Leonor e Juan, obrigada pelo apoio.

Aos meus amigos e companheiros de luta Laís e Marco Túlio, vocês sabem o quanto batalhamos para atingir este objetivo, amo muito vocês.... Essa conquista é de vocês também.

Aos meus amigos Kellen e Wicho que fizeram com que essa caminhada fosse bastante divertida. Obrigada pelo apoio, amizade e a cumplicidade. Ao Juanfe pelo carinho e pelos dias de diversão.

Aos meus amigos Hada e Jose pelo apoio e amizade. Ao Jose Samuel que com o seu sorriso muitas vezes alegrou minha vida...

À minha família Brasileira, Dona Eloisa, Senhor Antônio, Laura, Luide e toda a batalhada, obrigada por tornar os nossos dias mais agradáveis e fazer com que nos sentíssemos em família...

À professora Regina Célia Santos Mendonça por me tornar o que sou. Obrigada!

Aos professores Ronaldo Perez e Valeria Minim pela amizade, carinho, pelos conselhos, atenção e apoio durante toda essa caminhada.

Ao Román, Xime, Faider, Nélio e Rodrigo, amigos incondicionais que fiz nessa caminhada.

Ao Pedro pela ajuda, os ensinamentos e os risos nos momentos mais difíceis.

Aos amigos do NuBiomol: Edvaldo, Nívea e Prof. Mafra pelos risos, amizade, ajuda e apoio durante essa caminhada.

Às minhas coorientadoras Denise Mara Soares Bazzolli e Monique Renon Eller pelos conselhos e ensinamentos, por me levantar nas vezes que caí!

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade da realização deste curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PEC-PG) pelo apoio financeiro.

Aos meus colegas do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade de Córdoba pelo apoio e amizade, pelo tempo que compartilhamos responsabilidades e, especialmente pela terapia de risos diária... Adoro vocês.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desse sonho,

Meus sinceros agradecimentos.

SUMARIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. Introdução Geral	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1. <i>Escherichia coli</i>	3
2.1.1. Características gerais	3
2.1.2. <i>Escherichia coli</i> produtoras de Shiga toxina/enterohemorrágica (STEC/EHEC)	4
2.1.3. Resistência de <i>E. coli</i> O157:H7	7
2.2. Bacteriófagos: definição, características e aplicações	9
2.2.1. Ciclos de Infecção	10
2.2.2. Ciclo lítico de replicação	11
2.2.3. Estrutura e Caracterização de bacteriófagos	13
2.3. Fago T4	15
2.4. Referências	17
3. Capítulo 1: genome sequence of the enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> bacteriophage UFV-AREG1	22
Abstract	22
References	24
4. Capítulo 2: Análise comparativa do Bacteriófago UFV- AREG1: um vírus tipo T4 com potencial para biocontrole de <i>Escherichia coli</i> O157:H7	25
Resumo	25
Introdução	25
Material e Métodos	27
Isolamento do bacteriófago UFV-AREG1	27
Caracterização morfológica do fago UFV-AREG1	27
Extração do DNA do fago UFV-AREG1	28
Sequenciamento genômico e montagem do genoma	28
Predição e anotação de genes	29
Construção da árvore filogenética	30
Resultados e Discussão	31

Características morfológicas do fago UFV-AREG1	31
Análise da organização genômica	32
Cluster genômico 1: Processos de replicação do genoma	44
Cluster genômico 2: Proteínas estruturais e associadas a processos de lise celular	45
Presença de tRNAs no bacteriófago UFV-AREG1	47
Análise filogenética	48
Conclusões	50
Referências	51
5. Capítulo 3: Determinação do potencial do fago UFV-AREG1 como agente de biocontrole de <i>E. coli</i> O157:H7 na indústria de alimentos	54
Resumo	54
Introdução	55
Material e Métodos	56
Propagação e avaliação da especificidade do bacteriófago	56
Avaliação da estabilidade do bacteriófago UFV-AREG1	57
<i>Viabilidade dos bacteriófagos em temperatura ambiente e de refrigeração</i>	57
<i>Viabilidade dos bacteriófagos em luz ultravioleta (UV) e fluorescente</i>	57
<i>Viabilidade de bacteriófagos em diferentes valores de pH</i>	58
<i>Viabilidade de bacteriófagos em soluções sanitizantes</i>	58
<i>Análises estatísticas</i>	58
<i>One Step Growth</i>	59
Modulação na expressão proteica de <i>E. coli</i> O157:H7 pelo bacteriófago UFV-AREG1.....	59
Resultados e Discussão	60
Avaliação da estabilidade do bacteriófago UFV-AREG1	61
Parâmetros cinéticos	67
Modulação na expressão proteica de <i>E. coli</i> O157:H7 pelo bacteriófago UFV-AREG1	68
Conclusões	70
Referências	71
6. Conclusões gerais	74

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1: a) estrutura esquemática típica de bacteriófago com cauda. b) passos durante o processo infeccioso lítico e lisogênico ...	11
---	-----------

Capítulo 2

Figura 1: Características morfológicas do bacteriófago UFV-AREG1. Fotomicrografia obtida por Microscopia eletrônica de transmissão – MET.....	31
Figura 2: Organização do genoma do fago UFV-AREG1.....	43
Figura 3: Análise filogenética do genoma do fago UFV-AREG1.....	48
Figura 4: Alinhamento dos genomas e matriz de identidade dos mesmos obtidos na análise filogenética do fago UFV-AREG1 pelo software MrBayes	49

Capítulo 3

Figura 1: Efeito da temperatura sobre a viabilidade do fago UFV-AREG1.....	62
Figura 2: Efeito do pH na viabilidade do bacteriófago UFV-AREG1.....	64
Figura 3: Parâmetros cinéticos do bacteriófago UFV-AREG1.....	68
Figura 4: SDS – PAGE electrophoresis.....	69

LISTA DE TABELAS

Revisão Bibliográfica

Tabela 1: Perfil de resistência a antibióticos de <i>E. coli</i> O157:H7 isoladas de bovinos, suínos e humanos.....	8
Tabela 2: Classificação de bacteriófagos segundo o ICTV*.....	13

Capítulo 2

Tabela 1. Genomas comparados para obtenção da árvore filogenética ..	30
Tabela 2. Classificação taxonômica do fago UFV AREG1.....	32
Tabela 3: Análise comparativa do genoma do fago UFV-AREG1 com o genoma de outros <i>Myovirus</i>	32
Tabela 4: Características das “ <i>Open Reading Frames</i> ” (ORF’s) anotadas no genoma do fago UFV-AREG1.....	35
Tabela 5: Elementos regulatórios no genoma do fago de <i>Escherichia</i> UFV-AREG1.....	41
Tabela 6. Genes tRNA e uso de codons do fago UFV-AREG1	47

Capítulo 3

Tabela 1: Especificidade do bacteriófago UFV-AREG1	57
Tabela 2: Efeitos da luz UV e fluorescente sobre o fago UFV-AREG1.....	63
Tabela 3: Logaritmo de UFP/mL do pool de bacteriófagos submetidos a tratamento em diferentes soluções sanitizantes utilizadas na indústria de alimentos, após 15 min.....	66

RESUMO

LOPEZ, Maryoris E. S. D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2018. **CARACTERIZAÇÃO DO BACTERIOFAGO UFV-AREG1: POTENCIAL PARA O BIOCONTROLE DE *Escherichia coli* O157:H7.** Orientador: Regina Célia Santos Mendonça. Co-Orientadoras: Monique Renon Eller, Denise Mara Soares Bazzoli.

A bactéria *Escherichia coli* O157:H7 é um importante patógeno humano veiculado por alimentos. Sua ingestão pode causar diarreia sanguinolenta e nos casos mais agudos, a síndrome urêmica hemolítica. Neste estudo é reportado o isolamento, a caracterização e a organização do genoma do bacteriófago UFV-AREG1, capaz de infectar *E. coli* O157:H7, bem como o estudo da sua estabilidade em diferentes condições de pH, luz, temperatura e soluções sanitizantes que podem estar presentes na indústria de alimentos. O fago UFV-AREG1 foi isolado do residuário de água retirados de estábulos, e após a propagação atingiu um título de 10^{12} UFP·mL⁻¹. Ele possui cabeça icosaédrica de 114 por 84 nm e uma cauda contrátil de 117 por 23 nm. O bacteriófago UFV-AREG1 foi classificado na família *Myoviridae* e no gênero *T4virus*, o que o difere da maioria dos bacteriófagos específicos para essa bactéria. O bacteriófago UFV-AREG1 apresentou sensibilidade à luz UV e à fluorescente, no entanto este resultado não afeta o uso na indústria de alimentos. O fago UFV-AREG1 permaneceu viável após a simulação dos processos de sanitização com ácido peracético, peróxido de hidrogênio e dicloroisocianurato de sódio, em condições de pH extremas e temperaturas de 7 e 25 °C, o que indica um potencial de uso em condições que podem estar presentes na indústria de alimentos devido à sua estabilidade. O bacteriófago UFV-AREG1 possui um genoma linear, dupla fita (dsDNA) com 170.788 pb, densidade gênica de 1,60 gene/kb e um conteúdo G+C de 35,3%, que é a faixa observada nos bacteriófagos do gênero T4. Seu genoma apresenta 274 ORF's e possui 96 % de similaridade com os fagos HY01 e PEC4, mantém pelo menos 39 diferenças de produtos gênicos com o fago T4. Assim como todo fago do gênero *T4virus*, o genoma do fago UFV-AREG1 também foi aberto com o gene *rIIA*. O fago UFV-AREG1 possui dois *clusters* devidamente diferenciados, o primeiro corresponde aos produtos gênicos relacionados aos processos metabólicos virais e o segundo cluster agrupa as proteínas expressas com funções relacionadas à conformação estrutural do vírus e à lise celular propriamente dita. Uma explosão de uma única célula de *E. coli* O157:H7

infectada pelo fago UFV-AREG1 é capaz de produzir 18 novas partículas virais em aproximadamente 60 minutos. O fago UFV-AREG1 apresenta diversos elementos regulatórios como promotores do tipo bacteriano e terminadores independentes de Rho, bem como a presença de tRNAs. A maioria das proteínas codificadas não possuem domínios conservados. Este é o primeiro relato do estudo genômico do fago UFV-AREG1, o qual possui grande potencial para ser utilizado como agente de biocontrole de *E. coli* O157:H7 em variadas aplicações, tais como sensores, promotores de crescimento ou probióticos.

ABSTRACT

LOPEZ, Maryoris E. S. D.Sc. UFV, January 2018. **CHARACTERIZATION OF UFV-AREG1 BACTERIOPHAGE: POTENTIAL FOR BIOCONTROL OF *Escherichia coli* O157: H7.** Advisor: Regina Célia Santos Mendonça. Coauthors: Monique Renon Eller, Denise Mara Soares Bazzoli.

Escherichia coli O157:H7 is an important human foodborne pathogen. Their ingestion may cause bloody diarrhea and, in the most acute cases, hemolytic uremic syndrome. In this study, is reported the isolation, characterization and organization of the bacteriophage genome UFV-AREG1, capable of infecting *E. coli* O157: H7, as well as the study of its stability under different pH, light, temperature and sanitizing solutions are reported that could be present in the food industry. UFV-AREG1 phage were isolated from stable wastewater and after propagation can reach a titre of 10^{12} PFU·mL⁻¹. UFV-AREG1 phage has an icosahedral head with 114-by-84 nm and a contractile tail of 117 by 23 nm. The bacteriophage UFV-AREG1 was classified in the Myoviridae family and in the genus *T4virus*, which differs from most bacteriophages specific for this bacterium. The bacteriophage UFV-AREG1 showed sensitivity to UV and fluorescent light, however, this result does not affect the use in the food industry. The UFV-AREG1 phage remained viable and after the simulation of the sanitization processes with peracetic acid, hydrogen peroxide and sodium dichloroisocyanurate, in extreme pH conditions and temperatures of 7 and 25 ° C, indicating potential use under present conditions in the food industry due to its stability. The UFV-AREG1 bacteriophage has a linear, double-stranded genome (dsDNA) with 170,788 bp, with a gene density of 1.60 gene / kb and a G+C content of 35.3%, which is the range observed in bacteriophages of the *T4virus* genus. Its genome has 274 ORF's and has 96% similarity with the phage HY01 and PEC4, and maintains differences in at least 39 gene products with the phage T4. Like all phage of the *T4virus* genus, the UFV-AREG1 phage genome was opened with the *rIIa* gene. The UFV-AREG1 phage presented two clusters, the first one, corresponds to the gene products related to the viral metabolic processes and the second cluster groups the expressed proteins with functions related to the structural conformation of the virus and to the cellular lysis. A single cell of *E. coli* O157:H7 infected by the UFV-AREG1 phage is capable of producing 18 new viral particles in approximately 60 minutes. The UFV-AREG1 phage presents several regulatory elements such as

bacterial type promoters and independent-Rho terminators, as well as the presence of tRNAs. Most encoded proteins do not have conserved domains. This is the first report of the genomic study of UFV-AREG1 phage, which has great potential to be used as a biocontrol agent of *E. coli* O157: H7 in various applications, such as, sensors, growth promoters or probiotics.

1. Introdução Geral

As estirpes patogênicas de *Escherichia coli*, em especial, *E. coli* O157:H7 geram grande preocupação na Indústria de Alimentos. Com frequência estas estirpes têm sido isoladas de matrizes alimentares, principalmente em carnes e leite não processados, bem como em frutas e hortaliças. *E. coli* O157:H7 é de suma importância na saúde pública, pois é produtora da toxina Shiga e responsável por patologias como a Síndrome Urêmica hemolítica (SUH), insuficiência renal progressiva, lesões nos vasos sanguíneos e, em casos mais severos, pode levar à morte. As estirpes relacionadas a este tipo de infecção bacteriana são de difícil tratamento devido à gravidade da resistência aos antimicrobianos, geralmente adquirida pelos processos de transferência horizontal de genes. A Organização Mundial da Saúde (OMS) tem declarado como prioritária a busca por alternativas antibióticas para patógenos bacterianos resistentes aos antibióticos de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, incluindo a *E. coli* O157:H7.

A terapia fágica ressurge como alternativa à resistência antimicrobiana, pois, os bacteriófagos ou vírus que infetam bactérias foram descobertos há mais de 100 anos. Os Bacteriófagos são entidades virais semiautônomas que possuem genoma próprio e utilizam os recursos energéticos, metabólicos e a síntese proteica das bactérias para sua replicação. Geralmente o ciclo tem como finalização a morte da célula bacteriana. Desde a sua descoberta os bacteriófagos são considerados antimicrobianos naturais, atuando como agentes de biocontrole, potencial este que pode ser explorado e extrapolado pelas indústrias de alimentos. Os bacteriófagos da ordem *Caudovirales* são amplamente usados como agentes de biocontrole. As famílias mais estudadas como agentes de biocontrole de patógenos dentro desta ordem são a *Siphoviridae*, *Myoviridae* e a *Podoviridae*. Para efeitos de biocontrole os bacteriófagos mais utilizados são aqueles que apresentam ciclo lítico de replicação. Embora os bacteriófagos tenham potencial de aplicação em diferentes áreas, a eficácia delas depende de vários fatores, tais como o coeficiente de multiplicidade de infecção (MOI), os múltiplos fatores físico-químicos e a rota de acesso ao micro-organismo, o qual depende da matriz ou ambiente onde é requerido o biocontrole.

Produzir bacteriófagos em escala industrial está se tornando uma atividade “muito comum”. Embora o uso dos bacteriófagos tenha sido aprovado pela FDA desde o ano de 2005, ainda assim são muitos os desafios encontrados pela frente, especialmente em termos de regulamentação e aceitação. Para o melhor entendimento da terapia fágica e de suas limitações, o sequenciamento genômico tem sido utilizado como uma ferramenta para entender e elucidar os mecanismos de ação dos bacteriófagos, explorar e potencializar as aplicações dos mesmos. A informação contida no material genético facilita a predição da expressão proteica dos bacteriófagos e a sua classificação taxonômica, também permite inferir e prever a segurança na aplicação. As incertezas em termos de comercialização destes produtos estão relacionadas à disseminação de genes de resistência, à liberação de toxinas presentes nas células bacterianas após a lise celular, principalmente no caso de aplicações em alimentos. Resumindo, os aspectos favoráveis e pouco favoráveis dos bacteriófagos geram a necessidade de caracterizar os bacteriófagos de forma previa à aplicação para garantir-lhes segurança, potencialização de uso e favorecer a construção da legislação que os regulem como agentes antimicrobianos.

Em concordância com o que foi anteriormente exposto, este trabalho conta com uma revisão de literatura e três capítulos. O primeiro capítulo mostra os primeiros resultados relacionados ao sequenciamento genômico e o anúncio do genoma publicado na revista *Genome Announcements*. O segundo capítulo corresponde à anotação genômica do bacteriófago UFV-AREG1 com potencial de biocontrole para *E. coli* O157:H7 e o terceiro capítulo apresenta os resultados e a análise do estudo da estabilidade deste fago frente às condições de exposição na cadeia de produção de alimentos.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. *Escherichia coli*

2.1.1. Características gerais

E. coli é uma bactéria pertencente à família das enterobactérias, *Enterobacteriaceae*, que compreende bacilos Gram-negativos e anaeróbios facultativos com requerimentos nutricionais simples, catalase positiva e oxidase negativa. O habitat natural desse micro-organismo é o trato intestinal do homem e de outros animais homeotérmicos (SNEATH et al., 1986; JAFARI et al., 2012; VILA et al., 2016). A maioria das linhagens de *E. coli* não são patogênicas, pois são espécies comuns da microbiota entérica de animais e humanos.

Poucas estirpes de *E. coli* são patogênicas e de acordo com o conteúdo genômico e às diversidades de características, estas interagem de diferentes formas com o hospedeiro. As estirpes de *E. coli* podem ser agrupadas em três subconjuntos: estirpes comensais, estirpes patogênicas extraintestinais (ExPEC) e estirpes causadoras de diarreia (VILA et al., 2016). As estirpes comensais de *E. coli* fazem parte da microbiota natural do cólon de animais e, em condições normais, não oferecem riscos ao ser humano. Tanto as estirpes comensais quanto as extraintestinais podem causar doenças quando o inóculo encontra-se em grande número ou quando o conteúdo intestinal é extravasado para a cavidade abdominal (SINGER, 2015; VILA et al., 2016). Estirpes de *E. coli* patogênicas extraintestinais são frequentemente associadas com infecções no trato urinário, uma vez que possuem fatores de virulência específicos para a colonização desse tipo de ambiente (SINGER, 2015).

Várias estirpes patogênicas de *E. coli* são caracterizadas por sua capacidade de produzir potentes enterotoxinas. São conhecidas aproximadamente 200 estirpes patogênicas deste tipo de bactéria. Várias delas são responsáveis por doenças diarreicas de alto risco e infecções do trato urinário (MADIGAN et al., 2010). As linhagens patogênicas são divididas em categorias de acordo com o tipo de toxina produzida e das doenças que causam. Esta seção será dedicada exclusivamente a *E. coli* O157:H7.

2.1.2. *Escherichia coli* produtoras de Shiga toxina/enterohemorrágica (STEC/EHEC)

O principal fator de virulência deste tipo de bactéria e o que define este grupo é a capacidade de produzir uma citotoxina similar à produzida por *Shigella dysenteriae*. A toxicidade desta toxina também foi demonstrada para células do tipo “Vero”, resultando no sistema de nomenclatura paralelo: *E. coli* produtoras de Shiga/Vero Toxina, STEC e EHEC, respectivamente. A identificação deste novo grupo emergente de bactérias *E. coli* patogênicas ocorreu em 1983, quando um sorotipo de *E. coli* O157:H7 foi associado a surtos de diarreia sanguinolenta (JAFARI et al., 2012).

Muitas estirpes de *E. coli* produtoras de Shiga toxina emergiram como patógenos de origem alimentar associados aos surtos. O sorotipo O157:H7 é considerado o mais importante e, logo, o mais estudado nos dias atuais (JAFARI et al., 2012; VILA et al., 2016). Atualmente um grande número de sorotipos associados a diversos surtos de estirpes diferentes são reconhecidos. Este grupo inclui os sorotipos O26:H11, O45:H2, O103:H2, O104:H4; O111:H8, O121:H19 e O145:H28 (DELANNOY et al., 2013; LOZINAK et al.; 2016).

Os sintomas associados às estirpes de *E. coli* produtoras de Shiga toxina (STEC) diferenciam-se muito entre os pacientes. Os quadros podem variar desde portadores assintomáticos da bactéria até à diarreia aquosa simples. Os casos mais severos podem resultar em diarreia sanguinolenta (colite hemorrágica) e síndrome hemolítico-urêmica (SHU), uma insuficiência renal de caráter progressivo que pode resultar na destruição de hemácias e plaquetas, além de lesões nas paredes dos vasos sanguíneos (DELANNOY et al., 2013; JAFARI et al., 2012).

Nos Estados Unidos essa bactéria é frequentemente associada a surtos, sendo considerada um dos patógenos emergentes de maior preocupação em relação à saúde pública. Segundo o CDC entre os anos de 2006 e 2017, 1040 surtos foram associados a este micro-organismo, dos quais 475 resultaram em hospitalizações, sendo 96 destes diagnosticados com SHU e 7 resultaram em morte. A carne bovina esteve relacionada a várias ocorrências dos principais surtos causados por *E. coli* O157:H7 (CDC, 2017). A enfermidade associada a *E. coli* O157:H7 é uma doença de notificação obrigatória nos

EEUU. O diagnóstico é realizado a partir do cultivo e da identificação dos antígenos O (lipopolissacarídico) e H (flagelar), bem como das toxinas por métodos sorológicos. A identificação das linhagens é realizada por análises de DNA (MADIGAN et al., 2010). A *E. coli* O157:H7 se diferencia de outras bactérias da mesma espécie basicamente nos genes adquiridos em processos evolutivos e que conferem as características de patogenicidade.

O tamanho médio do cromossomo da *E. coli* O157:H7 é de 5,5 Mb. Este genoma inclui uma sequência em torno de 4.1 Mb que é conservada em todas as estirpes de *E. coli* (LIM et al., 2010). O restante do material genético é específico de *E. coli* O157:H7, a grande maioria dessas sequências foram adquiridas por transferência horizontal de genes, tais como profagos e elementos semelhantes a probacteriófagos. A *E. coli* O157:H7 contém 463 genes associados a DNA de bacteriófagos (CROXEN et al., 2013; LIM et al., 2010).

A estirpe *E. coli* O157:H7 é assim denominada pois expressa o antígeno somático O, de natureza lipopolissacarídica, do tipo 157 e a proteína flagelar H do tipo 7, a partir de um DNA plasmidial pO157 que varia de 92 a 104 kb (LIM et al., 2010). Em um estudo feito por Trees *et al.* (2014), foram sequenciadas 240 estirpes de *E. coli* patogênicas causadoras de diarreia, das quais 228 eram produtoras de Shiga toxina. Neste estudo o tamanho médio do genoma cromossomal completo foi em torno de 5,4 Kb.

Assim como EPEC as estirpes de *E. coli* produtoras de Shiga toxina também apresentam a ilha de patogenicidade localizado no "*locus of enterocyte effacement*". Esse *locus* apresenta em uma extremidade os genes *espA*, *espB* e *espD* que codificam proteínas necessárias para a transdução de sinal e atividade A/E (Attachment/Effacement). Seguidos pelo gene *eae* que codifica a proteína intimina, e o gene *tir*, uma proteína receptora de intimina que é translocada para a membrana da célula do epitélio intestinal (CROXEN et al., 2013; NGUYEN E SPERANDIO, 2012). Na porção final do *operon* encontram-se os genes que codificam um aparelho de secreção necessário para a expulsão de proteínas, produto dos genes *espA*, *espB* e *espD*. Esse mecanismo de secreção é responsável pela adesão das células à parede intestinal,

seguida pela destruição física das microvilosidades (CROXEN et al., 2013; LIM et al., 2010).

Um dos principais fatores de virulência que caracteriza as bactérias *E. coli* enterohemorrágicas é a presença dos genes necessários para a biossíntese da citotoxina Shiga. Existem dois tipos de Shiga toxina isolados a partir desse grupo, a Stx1a, que se difere em apenas um aminoácido da toxina produzida por *Shigella dysenteriae*, e a Stx2a que tem menos de 60% de homologia com Stx1a (JAFARI et al., 2012).

Stx1a e Stx2a são peptídeos codificados pelo genoma da célula. Os genes referentes à síntese dessas cadeias de aminoácidos foram transferidos para as espécies de *E. coli* por meio de citotoxinas codificadas por bacteriófagos líticos (JAFARI et al., 2012; MELTON-CELSA, 2014). Estudos demonstraram que o *operon stx* está presente no genoma de bacteriófagos do gênero lambda (MELTON-CELSA, 2014).

Essa toxina é um peptídeo de origem microbiana e, tanto Stx1a quanto Stx2b, são constituídas por duas cadeias polipeptídicas A e B, sendo classificadas na família de toxinas AB₅ (JAFARI et al., 2012). Em Stx1a a cadeia peptídica A apresenta 293 aminoácidos, enquanto a Stx2a apresenta 297, sendo quatro aminoácidos a mais na região carboxi-terminal. A cadeia B é pentomérica, apresentando cinco subunidades com 69 aminoácidos cada em Stx1 e 71 aminoácidos em Stx2 (MELTON-CELSA, 2014).

Para ambos os tipos de Shiga toxina, a cadeia B é responsável por identificar as células que apresentam o receptor globotriaosilceramidas (Gb3s) na superfície celular e permitem a internalização da citotoxina na mucosa intestinal humana e em células epiteliais renais, resultando em morte celular (JAFARI et al., 2012; MELTON-CELSA, 2014). A região do peptídeo responsável pela ação patogênica é a cadeia A, que após a clivagem enzimática por tripsina, atua como uma enzima bloqueadora da síntese proteica nas células do hospedeiro (MELTON-CELSA, 2014). A Shiga toxina do tipo Stx2a é geralmente mais severa e frequentemente mais isolada de pacientes com SHU (JAFARI et al., 2012).

A hemolisina é uma toxina formadora de poros na membrana de células intestinais (CROXEN et al., 2013). Essa citotoxina é um fator de virulência codificado

pelo plasmídeo pO157. O operon de hemolisina (*ehxCABD*) codifica todos os genes necessários para a síntese e transporte de hemolisina até o citosol das células da mucosa do hospedeiro. Essa toxina está presente em várias estirpes produtoras de Shiga toxina, sua sequência de aminoácidos é altamente conservada entre diferentes sorotipos de EHEC, como O157: H7, O111: H8 e O8: H19 (LIM et al., 2010).

2.1.3. Resistência de *E. coli* O157:H7

Três importantes sistemas de resistência ao ácido foram identificados em *E. coli*: o sistema AR1 (reprimido por glicose ou oxidativo), o sistema AR2 (dependente do glutamato) e o sistema AR3 (dependente de arginina) (LIM et al., 2010; NGUYEN E SPERANDIO, 2012). O mecanismo de funcionamento do sistema AR1 ainda não é completamente compreendido. Entende-se que o mecanismo como um todo atua na redução de algum composto celular para evitar o efeito dos prótons e da acidificação do citoplasma da bactéria. Além disso, sabe-se também que o sistema é inibido na presença de glicose em culturas *in vitro* (LIM et al., 2010; NGUYEN E SPERANDIO, 2012).

Os sistemas AR dependentes de glutamato e arginina possuem modos de ação similares. As enzimas glutamato descarboxilases GadA e GadB ou a arginina descarboxilase AdiA convertem o glutamato ou a arginina em ácido γ -aminobutírico ou agmatina, respectivamente, com o próton no citoplasma adquirido a partir do meio extracelular. Essa absorção dos prótons aumenta o pH interno e ajuda manter a homeostase no interior da célula (NGUYEN E SPERANDIO, 2012). A resistência ácida de *E. coli* O157 e outras EHEC, podem estar associadas à capacidade destes organismos causarem doenças a partir de uma dose mínima infectiva muito baixa (LAW, 2000; LIM et al., 2010).

Além da capacidade de causar a doença com poucas células, a *E. coli* O157:H7 vem mostrando resistência ao tratamento convencional com antimicrobianos, embora estes não sejam muito utilizados. A resistência aos antibióticos é um assunto crescente nos dias atuais, uma vez que os tratamentos de doenças com drogas químicas são atualmente os mais utilizados. Embora o tratamento de infecções causadas por estirpes

de *E. coli* O157:H7 e outras STEC não seja recomendado, observa-se a resistência em múltiplos isolados. Nesse tipo de bactéria, os genes que conferem resistência a antibióticos estão localizados em DNA extracromossomal plasmidial (ATEBA E BEZUIDENHOUT, 2008; CROXEN et al., 2013).

Ateba e Bezuidenhout (2008) isolaram estirpes de *E. coli* O157:H7 a partir de fezes de bovinos, suínos e de humanos contaminados com essa bactéria, construindo o perfil de resistência a antibióticos (Tabela 1).

Tabela 1: Perfil de resistência a antibióticos de *E. coli* O157:H7 isoladas de bovinos, suínos e humanos.

Fonte de isolamento	Quantidade de isolados que apresentaram resistência								
	AP	C	T	Nor	S	E	Ne	K	Smx
Bovinos (n = 19)	3	3	15	0	5	19	0	3	19
Suínos (n = 60)	22	7	58	2	38	47	17	7	57
Humanos (n = 3)	3	1	3	0	0	3	0	0	3

Onde: Ap (ampicilina), C (cloranfenicol), T (tetraciclina), Nor (norfloxacina), S (estreptomicina), E (eritromicina), Ne (neomicina), K (canamicina), Smx (sulfametoxazole). Fonte: Adaptado de Ateba e Bezuidenhout (2008).

O conhecimento sobre os mecanismos de virulência da *E. coli* causadora de diarreia tem sido estudado ao longo dos anos, embora esses fenômenos ainda não sejam totalmente compreendidos. Estes organismos afetam um amplo número de células eucarióticas utilizando diversos arranjos genéticos para colonizar, multiplicar, disseminar e superar tratamentos antibióticos que levam à intervenção da infecção (JAFARI et al., 2012).

Devido aos mecanismos de ação e à resistência antibiótica na maioria deste e de outros patógenos de importância na saúde pública, vem-se promovendo uma pressão pela obtenção de novos antimicrobianos que possam substituir os antibióticos tradicionais de uso repetitivo. Assim, os bacteriófagos se apresentam como uma alternativa viável em relação à resistência antimicrobiana.

2.2. Bacteriófagos: definição, características e aplicações.

Os Bacteriófagos são entidades genéticas semiautônomas que têm como objetivo a adesão e infecção das células de micro-organismos procariotos sem, no entanto causar danos às células de outros organismos (ABEDON, 2016; AJUEBOR et al., 2016). Os bacteriófagos são capazes de infectar e causar a lise celular em hospedeiros específicos, resultando em sua replicação e propagação (ABEDON et al., 2011; BÁRDY et al., 2016). Devido à especificidade lítica, estudos sugerem que a aplicação de bacteriófagos é considerada segura para os seres humanos (ABEDON et al., 2011; BAI et al., 2016).

Os primeiros relatos sobre a ação bactericida de bacteriófagos correspondem a Ernest Hankin (1896) e Nikolau Pyodorovich Gamaleya (1898). Posteriormente, em 1915, Frederick Twort cria a hipótese de que o efeito poderia ser devido à ação viral, no entanto esta teoria não foi confirmada. A descoberta oficial dos bacteriófagos foi atribuída a Felix D'Herelle no ano de 1917, este demonstrou que a atividade antibacteriana observada era causada por vírus com capacidade de invadir a maquinaria celular da bactéria e gerar a sua morte (HUNGARO et al., 2014).

Desde a sua descoberta os bacteriófagos vêm sendo considerados como antimicrobianos naturais no controle de bactérias patogênicas (AJUEBOR et al., 2016; CISEK et al., 2017; BÁRDY et al., 2016). Uma única espécie ou um *pool* de bacteriófagos já foram usados para controlar e/ou detectar a *Escherichia coli* O157: H7 (CARTER et al., 2012; LOPEZ, 2013), *Salmonella* entérica (CHEN et al., 2017; PEREIRA et al., 2016; RADFORD et al., 2017) *Campylobacter jejuni* (FIRLIEYANTI et al., 2016; ZAMPARA et al., 2017), *Listeria monocytogenes* (GUTIÉRRER et al., 2017; RADFORD et al., 2017), *Staphylococcus aureus* (XIA E WOLS, 2014) e demais patógenos de interesse alimentar.

Com relação ao material genético os bacteriófagos, em sua maioria, apresentam um genoma composto por um DNA de fita dupla, igual ao de seus hospedeiros (BAI et al., 2016), no entanto já foram reportados bacteriófagos com material genético na forma de RNA ou DNA de fita simples (NIVONE et al., 2011). O material genético fágico

codifica proteínas do capsídeo viral e enzimas responsáveis pela lise bacteriana no final do ciclo de replicação (BAI et al., 2016; HATFULL e HENDRIX, 2011).

2.2.1. Ciclos de Infecção

A infecção inicia-se com a adsorção do fago na superfície bacteriana, seguida da injeção do material genético viral no citoplasma. Após este passo o processo pode seguir duas rotas: lítica ou lisogênica (figura 1) (HUNGARO et al, 2014). Durante o ciclo lisogênico o genoma viral é frequentemente integrado no cromossomo bacteriano na forma de profago e permanece em um estado latente, sendo replicado em células filhas por muitas gerações (INAL, 2003). Isto pode alterar o fenótipo do hospedeiro e em alguns casos incrementar a patogenicidade da bactéria (FIGUEROA-BOSSI et al, 2001). Alguns fatores de virulência são frequentemente codificados por bacteriófagos temperados, os quais podem ser passados à bactéria por processos de tradução (HUNGARO et al, 2014; BOYD e BRÜSSOW, 2002; BOYD et al, 2001). Os bacteriófagos dormentes podem ativar o seu ciclo lítico através de estímulos específicos, tais como danos no DNA bacteriano (HUNGARO et al, 2014; MONK et al, 2010).

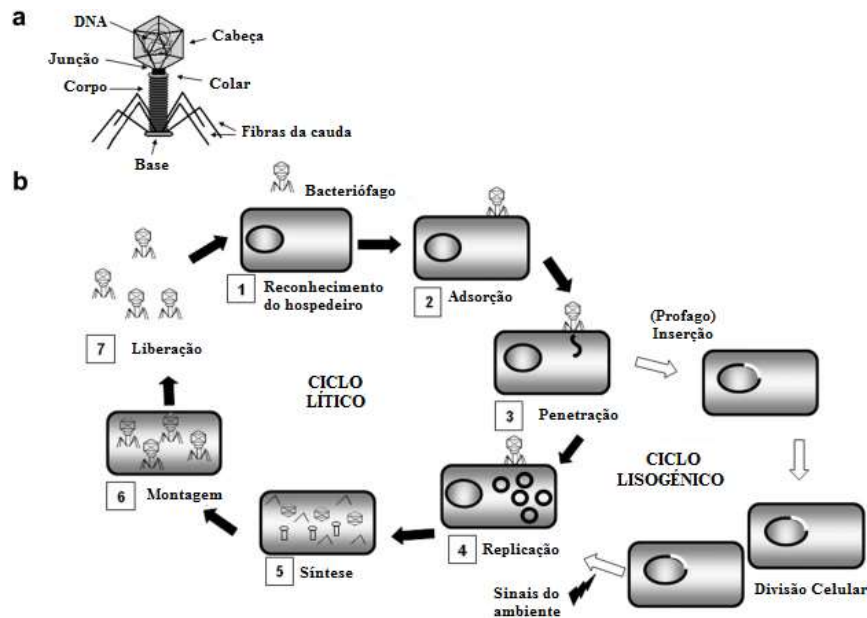


Figura 1: a) estrutura esquemática típica de bacteriófago com cauda. b) passos durante o processo infeccioso lítico e lisogênico. Adaptado de Garcia et al. (2010).

2.2.2. Ciclo lítico de replicação

No ciclo lítico quando o DNA viral atinge o citoplasma, este assume o controle da maior parte da maquinaria metabólica do hospedeiro e começa a expressar proteínas essenciais à rápida replicação do DNA fágico, seguida da transcrição de genes tardios que formam a estrutura da progênie fágica. Posteriormente ocorre a empacotamento do genoma viral, levando ao acúmulo de partículas virais no citoplasma bacteriano. A lise celular é mediada pela produção de proteínas tardias Holinas e endolisinas, que contribuem com a liberação de até 100 novos vírus (HUNGARO et al, 2014; OLIVEIRA et al, 2012). Este processo pode ser repetido diversas vezes, desde que o hospedeiro bacteriano esteja presente numa quantidade suficiente e com condições fisiológicas para suportar a replicação (HUNGARO et al, 2014; HARPER e KUTTER, 2008). O sistema lítico Holinas-lisinas é codificado por bacteriófagos com DNA de cadeia dupla (dsDNA) (YOUNG et al, 2000).

O ciclo lítico dos vírus é constituído por seis etapas consecutivas (WANG et al., 2013). Inicialmente o bacteriófago colide de forma aleatória com a célula bacteriana e adere-se por intermédio das proteínas da cauda (WANG et al., 2013). A adsorção é constituída por uma etapa de reconhecimento fago/hospedeiro, nesta, a cauda também é a estrutura viral responsável por esse processo (BAI et al., 2016).

Após a adesão do fago na parede celular bacteriana o material genético é injetado no citoplasma do hospedeiro por diferentes mecanismos: contração da cauda, pressão osmótica ou transporte específico mediado por proteínas (BAI et al., 2016). Em seguida o material genético do fago é inserido na bactéria (ABEDON et al., 2011; BAI et al., 2016; WANG et al., 2013). Segue a replicação, transcrição e tradução do material genético viral, o que resulta na síntese de proteínas estruturais e várias cópias do genoma fágico (BAI et al., 2016). Os bacteriófagos usam a maquinaria celular do hospedeiro (DNA-polimerase, RNA-polimerase e ribossomos) para a formação das macromoléculas necessárias para a geração das novas progênies virais (ABEDON, 2016).

O próximo estágio é conhecido como maturação. Neste, as proteínas traduzidas e o material genético replicado são organizados para formar as novas partículas fágicas

completas (ABEDON et al., 2011; BAI et al., 2016). O número de bacteriófagos gerados a partir da infecção de um único bacteriófago em uma única célula hospedeira é denominado *burst size* (WANG et al., 2013).

Esse processo de infecção, multiplicação e liberação resulta na morte celular. Dessa forma, os bacteriófagos líticos ou mesmo suas enzimas líticas podem ser usados como agentes para o controle de bactérias nos mais diversos campos de aplicação, sendo necessária a caracterização completa do vírus para garantir segurança na aplicação (AJUEBOR et al., 2016; SCHMELCHER E LOESSNER, 2016).

2.2.3. Estrutura e Caracterização de bacteriófagos

Os Bacteriófagos são vírus que infectam bactérias e sequestram a maquinaria celular para os seus fins de replicação, característica que permite classifica-los como parasitas intracelulares obrigatórios (HUNGARO et al, 2014; MONK et al., 2010). Os bacteriófagos são heterogêneos quanto as suas propriedades estruturais, físico-químicas e biológicas, o que sugere que possuem origens polifiléticas (KUTTER e SULAKVELIDZE, 2005).

Segundo o comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) os bacteriófagos podem ser classificados em relação à morfologia e ao tipo de ácido nucleico (RNA ou DNA, de cadeia simples ou dupla). Na atualidade os bacteriófagos encontram-se classificados em 10 famílias, 6 subfamílias e 58 gêneros, estes encontram-se relacionados na tabela 1 (HUNGARO et al, 2014).

Tabela 2: Classificação de bacteriófagos segundo o ICTV*

Família	Acido nucleico	Morfologia	Gênero	No. de espécies identificadas
<i>Corticoviridae</i>	dsDNA	Capsídeo icosaédrico com camada lipídica.	<i>Corticovirus</i>	1
<i>Cystoviridae</i>	dsRNA	Envelopado, Capsídeo icosaédrico, lipídeos.	<i>Cystovirus</i>	1
<i>Inoviridae</i>	ssDNA	Haste moldado com simetria helicoidal.	<i>Inovirus</i> e <i>Plectrovirus</i>	43
<i>Leviviridae</i>	ssRNA	Capsídeo quase icosaédrico.	<i>Allolevivirus</i> e <i>levivirus</i>	4
<i>Microviridae</i>	ssDNA	Capsídeo icosaédrico.	<i>Bdellovirus</i> , <i>Chlamydialeivirus</i> , <i>Spiromicrovirus</i>	12

			<i>e Microvirus.</i>	
<i>Myoviridae</i>	dsDNA	Cauda contráctil.	Bceomu-like vírus, I3-like vírus, T4vírus e 10 mais.	40
<i>Plasmaviridae</i>	dsDNA	Pleomórfico, envelopado, lipídeos, sem capsídeo.	<i>Plasmavirus</i>	1
<i>Podoviridae</i>	dsDNA	Pequeno, cauda não contráctil.	N4-like vírus, P22-like vírus, e 4 mas	20
<i>Siphoviridae</i>	dsDNA	Longo, cauda não contráctil.	C2-like vírus, T5-like vírus, lambda-like vírus, e 7 mais	31
<i>Tectiviridae</i>	dsDNA	Capsídeo icosaédrico, vesícula lipoproteica interior.	<i>Tectivirus</i> e 1 não assignado	5

ICTV: *International Committee on Taxonomy of Viruses*

A maioria dos bacteriófagos descritos até agora para fins de controle e identificação de bactérias pertencem à ordem *Caudovirales* e exibem caudas com comprimentos variáveis e cabeças icosaédricas contendo dsDNA (DNA de dupla fita) (HUNGARO et al, 2014; HAGENS e LOESSNER, 2007).

A especificidade dos bacteriófagos utilizados para biocontrole está relacionada à célula alvo, já que podem atacar mais de uma espécie ou, em alguns casos, uma única cepa bacteriana. No entanto existem bacteriófagos capazes de infectar uma ampla gama de organismos hospedeiros, incluindo várias espécies dentro de um gênero ou até mesmo membros de outros gêneros pertencentes à mesma família (HUNGARO et al, 2014; MONK et al, 2010; ZINK e LOESSNER, 1992). A especificidade dos bacteriófagos é regulada parcialmente por proteínas associadas à cauda, estas reconhecem diferentes moléculas da superfície bacteriana (HAGENS e LOESSNER, 2007). Como todos os vírus, os bacteriófagos se ligam a receptores específicos existentes na superfície dos hospedeiros para iniciar a sua replicação. Em geral todas as estruturas bacterianas expostas na parede celular constituem receptores de bacteriófagos em bactérias gram-positivas e gram-negativas, e em alguns casos as estruturas acessórias também funcionam como receptores, por exemplo, o flagelo e a cápsula (SKJURNIK e STRAUCH, 2006; GREGORACCI et al, 2006).

Os bacteriófagos da ordem *Caudovirales* são amplamente usados como agentes de biocontrole, uma vez que essa ordem compreende as famílias mais frequentemente isoladas: *Siphoviridae*, *Myoviridae* e *Podoviridae* (BAI et al., 2016). Os bacteriófagos classificados nesse nível taxonômico apresentam como estrutura básica uma cabeça e

uma cauda proteica. A cabeça é responsável por armazenar e conter o material genético, enquanto a cauda é responsável por identificar e aderir o fago no hospedeiro (CHRISTIE E DOKLAND, 2012). Esta revisão tem como objetivo destacar aspectos importantes do fago T4, o membro mais estudado da família *Myoviridae*.

2.3. Fago T4

Grande parte do entendimento do ciclo viral lítico é produto dos estudos dos bacteriófagos que infetam *E. coli*. O bacteriófago T4 se liga à superfície externa da célula pela interação com componentes específicos denominados receptores. Os carboidratos presentes no lipopolissacarídeo de bactérias Gram-negativas são os receptores reconhecidos pelo bacteriófago T4. Logo após o reconhecimento dos receptores celulares pelo bacteriófago T4 ocorre a penetração. São nos bacteriófagos que possuem cauda que se identificam os mecanismos mais complexos de penetração. O bacteriófago T4 apresenta uma cabeça que contém o dsDNA linear enovelado e uma cauda longa, relativamente complexa que apresenta em suas extremidades fibras e espículas. Os virions de T4 ligam-se às células de *E. coli* pelas fibras da cauda, estas interagem com os lipopolissacarídeos da célula sofrendo retração e permitindo o contato com a parede celular bacteriana. A ação da lisozima promove a formação de um poro no peptidoglicano, o que permite que o DNA do fago T4 penetre o interior do citoplasma de *E. coli* (MADIGAN et al., 2016).

Uma vez ocorrida a infecção pelo bacteriófago, os eventos no citoplasma celular são direcionados para a produção de novas cópias do genoma viral. A replicação do genoma do fago T4 é realizada pela sua própria polimerase codificada no seu genoma. Outras proteínas que possuem função na replicação do DNA viral do fago T4 e que estão codificadas no seu genoma são as helicases e as primazes. O bacteriófago T4 produz oito proteínas que formam o seu próprio complexo de replicação do DNA viral. O genoma de T4 é primeiramente replicado como uma unidade, em seguida várias unidades genômicas são recombinadas em suas extremidades originando uma longa molécula de DNA conhecida como concatêmero. Durante o empacotamento do DNA do bacteriófago T4 nos capsídeos o concatêmero não é clivado em uma sequência

específica, mas sim em um segmento de DNA longo o suficiente para preencher as cabeças do fago que são geradas (MADIGAN et al., 2016).

As bactérias vêm se desenvolvendo para evitar a infecção e os processos de replicação dos bacteriófagos. Um sistema antiviral denominado CRISPR é uma das armas utilizadas pelas bactérias contra os ataques virais, bem como a sua capacidade de destruir dsDNA viral pela ação de endonucleases de restrição. Outros mecanismos de resistência aos bacteriófagos são detalhados por Labrie et al., 2010. Os bacteriófagos possuem ou desenvolvem mecanismos protetores que superam os mecanismos de resistência, isso se dá pela introdução de modificações em seus próprios ácidos nucleicos, fazendo com que eles não fiquem sujeitos ao ataque enzimático.

Após a infecção o DNA do fago T4 é transcrito e traduzido dando início ao processo de síntese de novos virions, este começa em aproximadamente meia hora, o processo culmina com a liberação de novos vírus a partir da lise celular. Um minuto após ocorrer a ligação e penetração do hospedeiro pelo DNA do T4, a síntese de DNA e RNA do hospedeiro é interrompida e inicia-se a transcrição de genes fágicos específicos. Iniciada a tradução do mRNA viral, após 4 minutos de infecção começa a replicação do DNA fágico. O genoma do T4 pode ser dividido em três regiões que codificam proteínas precoces, intermediárias e tardias, essa divisão se dá pela ordem e eventos de expressão na célula, incluída a montagem para a geração de novas partículas virais.

2.4. REFERÊNCIAS

ABEDON, S. T., KUHL, S. J., BLASDEL, B. G., KUTTER, E. M. Phage treatment of human infections. **Bacteriophage**, 1(2), 66-85, 2011.

ABEDON, S. T. Bacteriophage exploitation of bacterial biofilms: phage preference for less mature targets? **FEMS microbiology letters**, 363(3), fnv246, 2016.

AJUEBOR, J., MCAULIFFE, O., O'MAHONY, J., ROSS, P., HILL, C., COFFEY, A. Bacteriophage endolysins and their applications. **Science Progress**, 99(2), 183 – 199, 2016

ATEBA, C. N.; BEZUIDENHOUT, C. C. Characterisation of Escherichia coli O157 strains from humans, cattle and pigs in the North-West Province, South Africa. **International journal of food microbiology**, v. 128, n. 2, p. 181-188, 2008.

BAI, J., KIM, Y., RYU, S. LEE, J. Biocontrol and Rapid Detection of Food-Borne Pathogens Using Bacteriophages and Endolysins. **Frontiers in Microbiology**, 7: 474, 2016.

BÁRDY, P., PANTUCEK, R., BENESÍK, M., DOSKAR, J. Genetically modified bacteriophages in applied microbiology. **Journal of Applied Microbiology** 121, 618—633, 2016.

BOYD E.F. & BRÜSSOW H. Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved. **Trends in Microbiology** 10: 521–529. 2002.

BOYD E.F.; DAVIS B.M. & HOCHHUT B. Bacteriophage–bacteriophage interactions in the evolution of pathogenic bacteria. **Trends in Microbiology** 9: 137–144. 2001.

CARTER, C. D., PARKS, A., ABULADZE, T., LI, M., WOOLSTON, J., MAGNONE, J., SENECA, A., KROPINSKI, A. M., SULAKVELIDZE, A. Bacteriophage cocktail significantly reduces Escherichia coli O157: H7 contamination of lettuce and beef, but does not protect against recontamination. **Bacteriophage**, 2(3), 178-185, 2012.

CISEK, A. A., DABROWSKA, I., GREGORCZYK, K. P., WYZEWSKI, ZBIGNIEW. Phage therapy in bacterial infections treatment: One hundred years after the discovery of bacteriophages. **Curr. Microbiol**, v. 74, p. 277-283, 2017.

CHEN, I. H., HORIKAWA, S., BRYANT, K., RIGGS, R., CHIN, B. A., BARBAREE, J. M. Bacterial assessment of phage magnetoelastic sensors for Salmonella enteric Typhimurium detection in chicken meat. **Food Control**, 71, 273-278, 2017.

CHRISTIE, G. E., DOKLAND, T. PIRATES OF THE CAUDOVIRALES. **Virology**, 434(2), 210-221, 2012.

CROXEN, M. A.; LAW, R. J.; SCHOLZ, R.; KEENEY, K. M.; WLODARSKA, M.; FINLAY, B. B. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical microbiology reviews**, v. 26, n. 4, p. 822-880, 2013.

DELANNOY, S.; BEUTIN, L.; FACH, P. Discrimination of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) from non-EHEC strains based on detection of various combinations of type III effector genes. **Journal of clinical microbiology**, v. 51, n. 10, p. 3257-3262, 2013.

FIRLIEYANTI, A. S., CONNERTON, P. L., CONNERTON, I. F. Campylobacters and their bacteriophages from chicken liver: The prospect for phage biocontrol. **International Journal of Food Microbiology**, 237, 121-127, 2016.

FIGUEROA-BOSSI, N., UZZAU, S., MALORIOL, D., & BOSSI, L. (2001). Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in Salmonella. **Molecular microbiology**, 39(2), 260-272.

GREGORACCI, G.B.; SILVEIRA, W.D. & BROCCCHI, M. The biology of bacteriophages. In: WEGRZYN, G; Modern Bacteriophages Biology and Biotechnology. **Kerala: Research Signpost** (in press), p. 36, 2006.

GUTIÉRREZ, D., RODRÍGUEZ-RUBIO, L., FERNÁNDEZ, L., MARTÍNEZ, B., RODRÍGUEZ, A., GARCÍA, P. Applicability of commercial phage-based products against *Listeria monocytogenes* for improvement of food safety in Spanish dry-cured ham and food contact surfaces. **Food Control**, 73, 1474-1482, 2017.

HAGENS, S. & LOESSNER, M.J. Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. **Applied Microbiology and Biotechnology** 76, 513–519. 2007.

HARPER, D.R. & KUTTER E. Bacteriophage: Therapeutic uses. The encyclopedia of life sciences. Chichester: **Wiley Online Library**. 2008.

HATFULL, G. F., & HENDRIX, R. W. Bacteriophages and their genomes. **Current opinion in virology**, 1(4), 298-303, 2011.

HUNGARO H.M.; LOPEZ M.E.S.; ALBINO L.A.A. & MENDONÇA R.C.S, **Bacteriophage: The Viruses Infecting Bacteria and Their Multiple Applications**, Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences, Elsevier. DOI: 10.1016/B978-0-12-409548-9.09039-4. 2014.

INAL, J. M. Phage therapy: a reappraisal of bacteriophages as antibiotics. **Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis-English Edition-**, 51(4), 237-244, 2003.

JAFARI, A.; ASLANI, M. M.; BOUZARI, S. Escherichia coli: a brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. **Iranian journal of microbiology**, v. 4, n. 3, p. 102-117, 2012.

KUTTER, E. e SULAKVELIDZE, A. Bacteriophages: Biology and applications. CRC Press, Boca Raton, FL. 2005.

LAW, D. Virulence factors of Escherichia coli O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 5, p. 729-745, 2000.

LIM, J. Y.; YOON, J. W.; HOVDE, C. J. A brief overview of Escherichia coli O157: H7 and its plasmid O157. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 5, 2010.

LOPEZ, M.E.S. Bacteriófagos para Biocontrole De *Escherichia coli* enterohemorrágica, 42 p, 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). **Universidade Federal de Viçosa**, Brasil. 2011.

LOZINAK, K. A.; JANI, N.; GANGIREDLA, J.; PATELL, I.; ELKINS, C. A.; HU, Z.; KASSIM, P. A.; MYERS, R. A.; LAKSANALAMAIL, P. Investigation of potential Shiga

toxin producing *Escherichia coli* (STEC) associated with a local foodborne outbreak using multidisciplinary approaches. **Food Science and Human Wellness**, v. 5, n. 3, p. 163-168, 2016.

MADIGAN, M. T., CLARK, D. P., STAHL, D., & MARTINKO, J. M. *Brock Biology of Microorganisms 13th edition*. Benjamin Cummings, 1128 p, 2010.

MELTON-CELSA, A. R. Shiga toxin (Stx) classification, structure, and function. **Microbiology spectrum**, v. 2, n. 2, 2014.

MONK A.; REES C.; BARROW P.; HAGENS S. & HARPER D. **Bacteriophage applications: Where are we now?** Letters in Applied Microbiology 51: 363–369. 2010.

NGUYEN, Y.; SPERANDIO, V. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 1 – 7, 2012.

NINOVE, L., NOUGAIREDE, A., GAZIN, C., THIRION, L., DELOGU, I., ZANDOTTI, C., CHARREL, R. N., DE LAMBALLERIE, X. RNA and DNA bacteriophages as molecular diagnosis controls in clinical virology: a comprehensive study of more than 45,000 routine PCR tests. **PLoS One**, 6(2), e16142, 2011.

OLIVEIRA, H., AZEREDO, J., LAVIGNE, R., KLUSKENS, L. D. Bacteriophage endolysins as a response to emerging foodborne pathogens. **Trends in food science technology**, 28(2), 103-115, 2012.

PEREIRA, C., MOREIRINHA, C., LEWICKA, M., ALMEIDA, P., CLEMENTE, C., CUNHA, Â., DELGADILLO, I., ROMALDE, J.L., NUNES, M. L., ALMEIDA, A. Bacteriophages with potential to inactivate *Salmonella* Typhimurium: Use of single phage suspensions and phage cocktails. **Virus Research**, 220, 179-192, 2016.

RADFORD, D., GUILD, B., STRANGE, P., AHMED, R., LIM, L. T., BALAMURUGAN, S. Characterization of antimicrobial properties of *Salmonella* phage Felix O1 and *Listeria* phage A511 embedded in xanthan coatings on Poly (lactic acid) films. **Food Microbiology**, 66, 117-128, 2017.

SCHMELCHER, M., LOESSNER, M. J. Bacteriophage endolysins: applications for food safety. **Current opinion in biotechnology**, 37, 76-87, 2016.

- SINGER, R. S. Urinary tract infections attributed to diverse ExPEC strains in food animals: evidence and data gaps. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1-9, 2015.
- SNEATH, P. H., MAIR, N. S., SHARPE, M. E., & HOLT, J. G. *Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 2*. **Williams & Wilkins**, 1986.
- SKURNIK, M. & STRAUCH, E. Phage therapy: Facts and Fiction. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, p. 5-14, 2006.
- VILA, J.; SÁEZ-LÓPEZ, E.; JOHNSON, J. R.; RÖMLING, U.; DOBRINDT, U.; CANTÓN, R.; GISKE, G. C.; NAAS, T.; CARATTOLI, A.; MARTÍNEZ-MEDINA, M.; BOSCH, J.; RETAMAR, P.; RODRÍGUEZ-BAÑO, J.; BAQUERO, F.; SOTO, S. M. *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. **FEMS microbiology reviews**, v. 40, n. 4, p. 43-463, 2016.
- WANG, Y., TIAN, J. P., WEI, J. Lytic cycle: A defining process in oncolytic virotherapy. **Applied Mathematical Modelling**, 37(8), 5962-5978, 2013.
- XIA, G., WOLZ, C. (2014). Phages of *Staphylococcus aureus* and their impact on host evolution. **Infection, Genetics and Evolution**, 21, 593-601.
- YOUNG R.; WANG ING-NANG & ROOF W.D. Phages will out: strategies of host cell lysis. **Trends in Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 120-128, 2000.
- ZAMPARA, A., SØRENSEN, M. C. H., ELSSER-GRAVESEN, A., BRØNDSTED, L. (2017). Significance of phage-host interactions for biocontrol of *Campylobacter jejuni* in food. **Food Control**, 73, 1169-1175.
- ZINK R. & LOESSNER M.J. Classification of virulent and temperate bacteriophages of *Listeria* spp. on the basis of morphology and protein analysis. **Applied and Environmental Microbiology** 58: 296–302. 1992.

3. Capítulo 1

(ARTICLE)

GENOME SEQUENCE OF THE ENTEROHEMORRHAGIC *Escherichia coli* BACTERIOPHAGE UFV-AREG1

Manuscript published at Genome Announc DOI: [10.1128/genomeA.00412-16](https://doi.org/10.1128/genomeA.00412-16)

ABSTRACT: Here, we present the genome sequence of the *Escherichia coli* bacteriophage UFV-AREG1. This phage was isolated from cowshed wastewater and showed specificity for enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895), *E. coli* O111 (CDC O11ab) and *E. coli* (ATCC 23229).

In general, bacteriophages show great diversity, morphology, biochemistry, and genetic content (COMEAU et al., 2007). The study of the T4-like bacteriophage genomic sequences has provided countless contributions for these fields, and specially to functional genomics and proteomics (MILLER et al., 2003; SHAHRBABAk et al., 2013).

The bacteriophage UFV-AREG1 was isolated from cowshed wastewater showing specificity to *Escherichia coli* O157:H7 (CDC EDL-933), *E. coli* O111 (CDC O11ab), and *E. coli* (ATCC 23229). Bacteriophage UFV-AREG1 can reach concentrations of over 10^{12} PFU/ml in laboratory conditions when the host is *E. coli* O157:H7. Transmission electron microscopy showed a phage with an icosahedral head of 114 by 86 nm and a contractile tail of 117 by 23 nm. These parameters allow the classification of UFV-AREG1 as a member of the *Myoviridae* family (YAUNG et al., 2015; COFFEY et al., 2014). UFV-AREG1 can remain viable after simulation of sanitization processes with sodium dichloroisocyanurate (219 ± 13 mg/L) and hydrogen peroxide (58.1 ± 5 mg/L). On the other hand, this phage lost viability after contact with peracetic acid (91 ± 17 mg/L).

The genome of UFV-AREG1 was sequenced using Illumina HiSeq by Macrogen (Seoul, Republic of Korea), yielding a total of 10,319,880 paired-end reads 100 bp in length. The sequenced reads were trimmed for quality (minimum Q30 score), and the genome sequence was assembled with a coverage of 5,600× using Geneious version

9.1.2 (Biomatters) with the genome of *Escherichia* phage HY01 (KF925357) as the reference. Genes were predicted from the genome using Prodigal version 2.50 (6), which revealed 274 open reading frames (ORFs). The proteins encoded by these ORFs were functionally annotated using BLAST searches (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) against the *GenBank* and UniProt databases.

The UFV-AREG1 genome comprises 170,788 bp of a linear dsDNA with a density of 1.60 gene/kb and a G+C content of 35.3%, which is within the range observed in T4-like phages (35.0% to 43.0%). UFV-AREG1 is more similar to *Escherichia* phages HY01 and PEC4 (KR233165), sharing 91.8% and 91.5% nucleotide sequence identities, respectively. The 274 predicted proteins show high similarity to previously described enteric phages and other T4-like phages. As a T4-like phage, the genome of UFV-AREG1 was also opened to the *rIIA* gene. The BLASTx searches showed that the genome of UFV-AREG1 differs from the *Enterobacteria* T4 (NC_000866) phage in 30 ORFs. Most of the proteins encoded by these ORFs do not have putative conserved domains. Among these proteins, four annotated ones in UFV-AREG1 related to the T4 phage were found: one receptor recognition protein (ORF 244), one transferase protein (ORF 42), and two structural proteins (ORFs 29 and 121).

The best understanding of the gene and proteins encoded by the UFV-AREG1 bacteriophage can provide new information about *E. coli* phages and their genetic diversity.

Accession number(s): The genome sequence of UFV-AREG1 is available in *GenBank* under the accession number KX009778.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol; <http://www.nubiomol.ufv.br>) of the Universidade Federal de Viçosa for supporting the data analysis.

The first author thanks CAPES for scholarship PEC-PG. This work was funded by the Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais–Brazil.

REFERENCES

COFFEY B, ROSS RP, O'FLYNN G. Complete Genome Sequence of vB_EcoM_112, a T-Even-Type Bacteriophage Specific for *Escherichia coli* O157:H7. **Genome Announcements**, 2014; 2(6):e00393-14. doi:10.1128/genomeA.00393-14.

COMEAU A. M., BERTRAND C., LETAROV A., TETART F., KRISCH H. M. Modular architecture of the T4 phage superfamily: a conserved core genome and a plastic periphery. **Virology**, 2007. 362(2):384-396 doi:10.1016/j.virol.2006.12.031.

MILLER ES, KUTTER E, MOSIG G, ARISAKA F, KUNISAWA T, RÜGER W. Bacteriophage T4 genome. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003. 67:86–156. doi:10.1128/MMBR.67.1.86-156

HYATT D, CHEN GL, LOCASCIO PF, LAND ML, LARIMER FW, HAUSER LJ. 2010. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. **BMC Bioinformatics** 11:119. 10.1186/1471-2105-11-119.

SHAHRBABAK S, KHODABANDEHLOU Z, SHAHVERDI A, SKURNIK M, ACKERMANN H, VARJOSALO M, YAZDI M, SEPEHRIZADEH Z. Isolation, characterization and complete genome sequence of PhaxI: a phage of *Escherichia coli* O157:H7. **Microbiology** 159(8):1629-1638 doi:10.1099/mic.0.063776-0

YAUNG SJ, ESVELT KM, CHURCH GM. Complete Genome Sequences of T4-Like Bacteriophages RB3, RB5, RB6, RB7, RB9, RB10, RB27, RB33, RB55, RB59, and RB68. **Genome Announcements**, 2015; 3(1):e01122-14. doi:10.1128/genomeA.01122-14.

4. Capítulo 2

(ARTIGO)

Análise comparativa do Bacteriófago UFV-AREG1: um vírus tipo T4 com potencial para biocontrole de *Escherichia coli* O157: H7

RESUMO: Neste trabalho reporta-se a análise da caracterização genômica do bacteriófago UFV-AREG1, isolado de águas residuais de estábulo, que apresenta especificidade contra *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895), *E. coli* O111 (CDC O11ab) e *E. coli* (ATCC 23229). A partir de todas as análises genéticas e morfológicas, este bacteriófago pode ser considerado um novo vírus do gênero *T4virus*, de ordem *Caudovirales* e família *Myoviridae*. O genoma do fago UFV-AREG1 compreende 170.788 bp de dsDNA linear contendo 274 ORF's, das quais 69 % possuem função conhecida. O fago UFV-AREG1 apresenta um conteúdo de G+C de 35,3 % e uma densidade gênica de 1,60 Genes/Kb. O fago UFV-AREG1 compartilha 96 % de identidade com os bacteriófagos *Escherichia* HY01 e o fago PEC4, revelando amplas regiões conservadas com genomas de bacteriófagos *T4virus* e conservação da maioria das proteínas. Este fago diferencia-se em 39 produtos proteicos do fago T4, o mais representativo do gênero *T4virus*. No genoma do bacteriófago UFV-AREG1 não foram identificados genes associados à virulência em espécies bacterianas, bem como genes relacionados com características lisogênicas. No genoma deste fago foram definidos dois *clusters* relacionados aos genes precoces (111 ORFs), ao metabolismo viral e aos genes tardios (50 ORF's) que codificam proteínas estruturais que se associam aos processos de lise celular, bem como os elementos regulatórios do genoma: 40 promotores, 2 terminadores independentes de *Rho* e 8 tRNAs. A análise filogenética sugere um espectro lítico variado, pois, além de infectar *E. coli* O157:H7 o fago UFV-AREG1 poderia infectar bactérias como *Shigella* e *Yersinia*. Esta caracterização é necessária para garantir segurança e viabilidade em posteriores aplicações do bacteriófago UFV-AREG1 na indústria de alimentos.

INTRODUÇÃO

E. coli O157:H7 é uma bactéria gram-negativa patogênica veiculada por alimentos, sua ingestão pode ocasionar diarreia sanguinolenta devido à produção de uma citotoxina denominada toxina Shiga (JAFARI et al., 2012). Essa bactéria tem sido associada a diferentes surtos de origem alimentar (CDC, 2017), ganhando importância entre os patógenos associados a problemas de saúde pública.

Na indústria de alimentos, esta bactéria é um indicador de contaminação fecal e o seu controle deve ser rigoroso, devido ao risco que representa. As últimas diretrizes da Organização Mundial da Saúde (OMS) estabelecem a necessidade de dirigir as pesquisas para a geração de novos antimicrobianos para esta e outras espécies da família *Enterobacteriaceae* dada a atual emergência devido à dificuldade causada pela resistência bacteriana (WHO, 2017). O bacteriófago UFV-AREG1 é estudado desde o ano 2012, sendo estes estudos focados na capacidade biosanitizante do bacteriófago, apresentando eficiência sobre *E. coli* O157:H7 similar a outros sanitizantes utilizados na indústria de alimentos. Este bacteriófago é capaz de reduzir mais de dois ciclos logarítmicos desta bactéria, sendo, portanto, uma ferramenta em potencial para o biocontrole desta em alimentos minimamente processados, superfícies e em equipamentos (LOPEZ, 2013). Outras aplicações do fago UFV-AREG1 têm sido exploradas, estas incluem a viabilidade em processos de encapsulamento e matrizes para possíveis aplicações, como promotores de crescimento em alimentação animal (BATALHA, 2017), e como componente de kits de detecção de *E. coli* O157:H7 utilizando microfluídica (BOGGIONE et al., 2017).

Devido aos problemas atuais da indústria de alimentos e da resistência bacteriana, a exploração de alternativas antimicrobianas é tida como prioritária, com isso o uso de bacteriófagos para este fim vem ganhando destaque. A preocupação gira em torno da falta de clareza na normatividade e na garantia de segurança do uso, fazendo-se necessários estudos que avaliem a segurança nas aplicações. A análise detalhada da sequência genômica é uma ferramenta determinante, pois, permite o entendimento da dinâmica de infecção e os principais genes relacionados ao processo, também possibilita a identificação de possíveis genes de virulência e de lisogenia que

possam participar em processos de transferência horizontal de genes e possíveis anomalias, que possam vir a afetar a segurança na aplicação.

O genoma do bacteriófago UFV-AREG1 foi sequenciado e anotado o que levou à classificação desse fago, sendo este classificado como um novo integrante do gênero *T4virus* capaz de infectar a *E. coli* O157:H7 (LOPEZ et al., 2016). Este trabalho tem como objetivo descrever e discutir a análise detalhada da anotação do genoma do fago UFV-AREG1, com ênfase no potencial de uso e segurança nas aplicações do bacteriófago para biocontrole de *E. coli* O157:H7 em alimentos.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento do bacteriófago UFV-AREG1: O fago UFV-AREG1 foi isolado de água residuária do estábulo da Universidade Federal de Viçosa utilizando como micro-organismo hospedeiro *E. coli* ATCC 11229. A especificidade sobre *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895), *E. coli* O111 (CDC O11ab) e *E. coli* (ATCC 23229) foi determinada por LOPEZ, 2013. Este vírus pertence ao banco de micro-organismos do Laboratório de Microbiologia de Patógenos de Origem Alimentar e Hídrico (LAMPOAH) (LOPEZ, 2013).

Caracterização morfológica do fago UFV-AREG1: Um volume de 1 mL da suspensão de bacteriófagos a 10^9 UFP·mL⁻¹ foi centrifugado a 26.000 x g por 60 minutos. O sedimento obtido foi lavado com solução de acetato de amônio 0,1 M e novamente centrifugado a 26.000 x g por 60 minutos. O sedimento foi ressuspensionado em 1 mL de água destilada e filtrado em membrana de acetato de celulose com poro de 0,22 µm (MILLIPORE). Uma alíquota de 8 µL da suspensão utilizada foi depositada na superfície de uma tela de microscopia eletrônica revestida com resina *formvar* para análise microscópica. Uma gota de solução aquosa de acetato de urânio 2% (m/v) foi colocada sobre a superfície da tela, permanecendo em contato por 15 segundos. A tela foi lavada com uma gota de água destilada e deixada secar em temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente foi feita a observação em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss, EM 109) em 80 kV, esta aconteceu no Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da Universidade Federal de Viçosa.

Extração do DNA do fago UFV-AREG1: O DNA do bacteriófago UFV-AREG1 foi extraído a partir de 1 mL de suspensão fágica, produto da infecção com hospedeiro, utilizando a metodologia descrita por Sambrook and Russels (2001) com modificações. Em 1 mL da suspensão de bacteriófagos foram adicionados 20 µL de clorofórmio. A mistura foi agitada por 10 minutos e centrifugada por 20 minutos a 12.000 x g, sendo coletada a fase aquosa. Esta teve adição de DNase e RNase (Sigma Aldrich®) para uma concentração final de 1 µg·mL⁻¹, deixando em repouso por 10 minutos em temperatura ambiente. Estas enzimas permitem a degradação de resíduos de ácidos nucleicos bacterianos que possam estar presentes na suspensão. Posteriormente foram adicionados 25 µL de proteinase K para uma concentração final de 1 mg·mL⁻¹ e 0,9 µL de SDS esta foi deixada em temperatura ambiente por 10 minutos. Uma primeira extração foi feita com fenol-clorofórmio (1:1) por 5 minutos. Procedeu-se a centrifugação por 10 minutos a 12.000 x g, recuperando a fase aquosa. Após centrifugação, as amostras foram colocadas imediatamente no gelo. Na segunda extração foi adicionado clorofórmio na proporção (1:1), em seguida as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000 x g, sendo mantidas a baixas temperaturas para evitar degradação do DNA. Foi recuperada a fase aquosa. Para efeitos de precipitação do DNA, foi adicionado acetato de amônio na concentração final de 3,5 M e isopropanol na relação 1:1, armazenando as amostras a -20 °C por aproximadamente 4 horas. Após esse procedimento as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 12.000 x g, recuperando o sedimento e deixando secar em temperatura ambiente por 5 minutos. Para remover o excesso de sal das amostras, a estas foram adicionadas 200 µL de etanol 70 % (v/v) centrifugando por 10 minutos a 12.000 x g, descartando-se o etanol e secando o sedimento em temperatura ambiente. O sedimento foi ressuspenso com 40 µL de água ultrapura, homogeneizando e estocando para posterior análise a -20 °C. O DNA obtido foi avaliado por espectrometria e por eletroforese em gel de agarose 0,8%, utilizando marcador lambda na concentração de 50 ng·mL⁻¹ para estimar a concentração do DNA obtido.

Sequenciamento genômico e montagem do genoma: O genoma do bacteriófago UFV-AREG1 foi sequenciado usando *Illumina HiSeq* (Macrogen - Seoul, Coreia) e nos dados analisados foram utilizados o software *Geneious* versão 9.1.2. (Biomatters). Os

reads sequenciados foram trimados para remover as bases sequenciadas com baixa qualidade, excluindo os nucleotídeos sequenciados com probabilidade de erro maior do que 0,001 (escore de qualidade Q30). O genoma do fago UFV-AREG1 foi montado tendo como referência o genoma do fago *Escherichia* phage HY01 (Código de acesso no *GenBank*: KF925357).

Predição e anotação de genes: Os genes do bacteriófago UFV-AREG1 foram preditos usando o software Prodigal versão 2.50 (HYATT et al., 2010), já as proteínas codificadas pelas *Open Reading Frames* (ORF's) foram funcionalmente anotadas por meio de pesquisas de similaridade usando o software *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para isso as sequências das ORF's preditas no genoma do fago UFV-AREG1 foram comparadas às sequências contidas nas bases de dados de sequências de nucleotídeos do *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/>), já as sequências traduzidas a partir das ORFs preditas foram comparadas com as sequências de proteínas presentes no Uniprot (<http://www.uniprot.org/>). Promotores bacterianos foram preditos usando o *webserver* PePPER (<http://genome2d.molgenrug.nl>). As sequências terminadoras independentes de *Rho* foram preditas pelo *webserver* ARNold do *Institut de Génétique et Microbiologie da Université Paris – SUD 11* (<http://rna.igmors.u-psud.fr/toolbox/arnold/>). As análises iniciais obtidas foram descritas por LOPEZ et al., 2016, o genoma foi depositado e se encontra disponível no site do *GenBank* sob o código de acesso KX009778. Nessa análise foram estabelecidas as diferenças genômicas entre o fago T4 e o fago UFV-AREG1 e as sequências dos genes (ou ORFs) dos fagos selecionadas nos respectivos genomas, as comparações foram feitas utilizando o software BLAST versão 2.6.0 (ALTSCHUL et al. 1990). Os alinhamentos foram feitos usando a ferramenta BLASTN, sendo considerados significativos somente aqueles que apresentaram um valor de E-value < 1e-25. Potenciais tRNAs foram preditos usando o software tRNAscan-SE versão 2.0 (LOWE AND CHAN, 2016), considerando o modelo bacteriano para a predição (<http://lowelab.ucsc.edu/cgi-bin/tRNAscan-SE2.cgi>).

Construção da árvore filogenética: Os genomas de possíveis bacteriófagos relacionados foram extraídos do *GenBank* e alinhados usando CustalW (parâmetros:

cost matrix=IUB; gap open cost=15; gap extend cost=6,66) no software *Geneious* versão 9.1.6, foi obtida uma matriz de identidade a partir do alinhamento desses genomas. Em seguida foi selecionado o modelo GTR+I+G como molde de substituição de nucleotídeos mais adequado às variações observadas no alinhamento, neste foi usado o software *jModeltest* versão 2.1.10 (DARRIBA et al., 2012). A árvore filogenética foi obtida por inferência bayesiana, usou-se o software *MrBayes* versão 3.2.6 (RONQUIST et al., 2012). A análise filogenética foi executada com o emprego do método *Bayesian Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) em duas corridas com 1.000.000 gerações. A convergência dos parâmetros foi avaliada e a análise alcançou uma distribuição estacionária após 100.000 gerações. Em seguida 10% das árvores geradas foram descartadas para obter a árvore filogenética consenso. Os códigos de acesso das sequências utilizadas na construção da árvore filogenética encontram-se relacionadas na tabela 1.

Tabela 1. Genomas comparados para obtenção da árvore filogenética.

Fago	Acesso GenBank
<i>Escherichia coli</i> O157 typing phage 7	KP869105
<i>Escherichia</i> phage wV7	HM997020
Enterobacteria phage RB51	FJ839693
Enterobacteria phage RB68	KM607004
Enterobacteria phage AR1 DNA	AP011113
Enterobacteria phage RB27	KM607000
<i>Escherichia</i> phage HY01	KF925357
<i>Shigella</i> phage pSs1	KM501444
<i>Escherichia</i> phage 7 UFV- AREG1	KX0097780
Bacteriophage RB32	DQ904452
Enterobacteria phage RB33	KM607001
Enterobacteria phage RB14	FJ839692
<i>Escherichia</i> phage ECML134	JX128259
<i>Shigella</i> phage SHFML11	KX130861
<i>Yersinia</i> phage phiD1	HE956711
<i>Escherichia</i> phage slur14	LN881736
<i>Shigella</i> phage SHBML501	KX130864
Enterobacteria phage T4	NC_000866
<i>Escherichia</i> phage vB EcoMUFV13	KU867876
<i>Shigella</i> phage Shf12	HM035025
<i>Escherichia</i> phage e11/2	KJ668714
<i>Escherichia</i> phage HY03	KR269718

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Características morfológicas do fago UFV-AREG1: De acordo com as imagens obtidas por meio da análise microscópica de transmissão, as partículas virais do fago UFV-AREG1 possuem cabeça icosaédrica e uma cauda tubular contrátil com fibras (Figura 1). A cabeça e a cauda do fago UFV-AREG1 têm tamanho aproximado de 114 x 86 nm e 117 x 23 nm, respectivamente (LOPEZ et al., 2016). O fago UFV-AREG1 apresenta semelhanças morfológicas e de tamanho com o fago HY01 também isolado de *E. coli* O157:H7, que possui um tamanho aproximado de 100 nm de cabeça icosaédrica e 100 nm de cauda tubular com fibras (LEE et al., 2016).

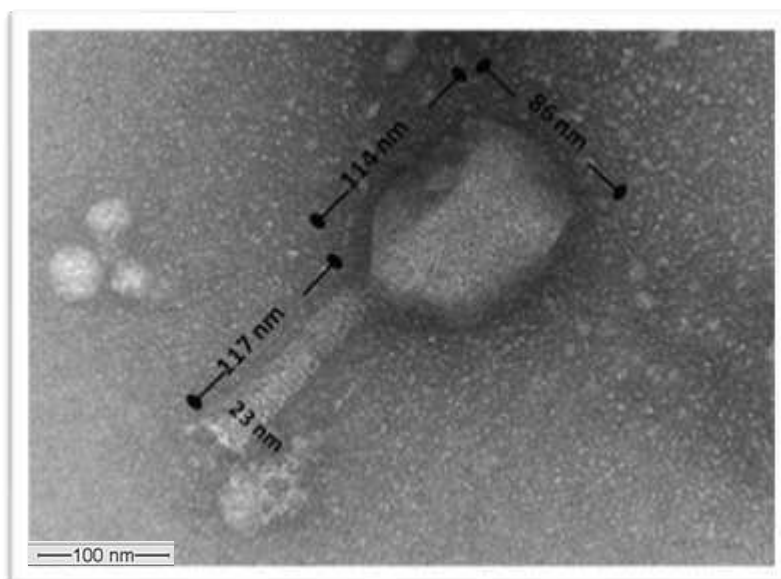


Figura 1: Características morfológicas do bacteriófago UFV-AREG1. Fotomicrografia obtida por Microscopia eletrônica de transmissão – MET.

As informações anteriormente apresentadas e a caracterização genômica do fago UFV-AREG1, também expostas em seções anteriores neste trabalho, permitem a classificação taxonômica deste de acordo com a tabela 2.

Tabela 2. Classificação taxonômica do fago UFV-AREG1.

Ordem	<i>Caudovirales</i>
Família	<i>Myoviridae</i>
Subfamília	<i>Tevenvirinae</i>
Gênero	<i>T4virus</i>
Espécie	UFV-AREG1

Análise da organização genômica: O sequenciamento do genoma do bacteriófago UFV-AREG1 gerou um total de 10.319.880 *reads* com tamanhos aproximados de 100 bp (LOPEZ et al., 2016). Estes dados foram usados para a montagem do genoma do bacteriófago UFV-AREG1 tendo como referência o genoma do fago HY01 (KF925357). A análise preliminar do genoma, a análise morfológica e a análise comparativa do genoma do fago UFV-AREG1 com outros bacteriófagos da Família *Myoviridae* (Tabela 3), permitiu a classificação do UFV-AREG1 como um fago do gênero *T4virus*. A família *Myoviridae* da qual pertence o fago UFV-AREG1 é uma das famílias de bacteriófagos de *E. coli* melhor caracterizada, nesta foram examinadas em torno de 200 bacteriófagos do gênero. No entanto uma limitada quantidade destes bacteriófagos foi sequenciada completamente (LIAO et al., 2011).

Tabela 3: Análise comparativa do genoma do fago UFV-AREG1 com o genoma de outros *Myovirus*

Fago	Acesso GenBank	Gênero	Tamanho do genoma (bp)	G+C (%)	CDS	Gene/Kb	Identidade (%)
UFV-AREG1	KX009778	<i>T4virus</i>	170.788	35,3	274	1,60	-
PEC04	KR233165	Unclassified	167.552	35,5	261	1,60	96
HY01	KF925357	<i>T4virus</i>	166.977	35,5	255	1,53	96
RB33	KM607001	<i>T4virus</i>	166.007	35,3	274	1,65	96
RB32	DQ904452	<i>T4virus</i>	165.890	35,0	270	1,63	96
RB51	FJ839693	<i>T4virus</i>	168.394	35,0	273	1,62	96
RB68	KM607004	<i>T4virus</i>	168.401	35,3	276	1,64	96
e11/2	KJ668714	<i>T4virus</i>	168.470	35,3	279	1,66	96
RB14	FJ839692	<i>T4virus</i>	165.429	35,0	274	1,66	96
UFV13	KU867876	<i>T4virus</i>	165.772	35,5	268	1,62	95
AR1	AP011113	<i>T4virus</i>	167.435	35,3	281	1,68	96
Phage 7	KP869105	Unclassified	167.747	35,4	269	1,60	96
wV7	HM997020	<i>T4virus</i>	166.452	35,4	273	1,64	96
SHBML-50-1	KX130864	<i>T4virus</i>	166.634	35,4	265	1,59	95
ECML-134	JX128259	<i>T4virus</i>	166.783	35,4	270	1,62	96
pSs-1	KM501444	<i>T4virus</i>	164.999	35,5	266	1,61	96
SHFML-11	KX130861	<i>T4virus</i>	170.650	35,2	269	1,58	95
Slur14	LN881736	<i>T4virus</i>	167.467	35,4	272	1,62	96
RB27	KM607000	<i>T4virus</i>	165.179	35,5	271	1,64	96
HY03	KR269718	Unclassified	170.770	35,3	269	1,57	96
phiD1	HE956711	<i>T4virus</i>	167.063	35,4	277	1,66	95
Shf12	HM035025	<i>T4virus</i>	165.919	35,6	265	1,60	96
T4	NC_000866	<i>T4virus</i>	168.903	35,3	278	1,65	95

O bacteriófago UFV-AREG1 possui um genoma linear dsDNA de 170.788 bp, conservando semelhanças com a maioria dos bacteriófagos sequenciados do tipo *T4virus*, incluindo RB49, RB32, AR1, RB51, RB69, T4, entre outros. O fago UFV-AREG1 apresenta um dos maiores genomas completamente sequenciados possuindo um conteúdo G+C de 35,3% (LOPEZ et al., 2016), o que o aproxima muito dos bacteriófagos que pertencem ao gênero *T4virus* (35% - 43%) e o distancia do conteúdo G+C do hospedeiro (aproximadamente 50%) (MILLER et al., 2003; LIAO et al., 2011).

A análise de predição de genes revelou que o genoma do bacteriófago UFV-AREG1 compõe-se de 274 ORF's, as quais codificam proteínas com, em média, 258 aminoácidos (Tabela 4). No genoma deste fago estas sequências codificadoras correspondem a aproximadamente 1,60 genes/Kb, o qual está em concordância com os bacteriófagos relacionados na tabela 4 e com a maioria dos bacteriófagos do gênero *T4virus*. Os Bacteriófagos incluídos no gênero *T4virus* possuem uma densidade gênica elevada, apresentando genes altamente compactados (LIAO et al., 2011). No genoma do fago UFV-AREG1 foram identificadas muitas regiões intergênicas, de tamanho inferior a 1400 bp. A maior destas regiões encontra-se entre as ORFs 131 e 132.

A comparação genômica pelo software BLAST (ALTSCHUL et al. 1990) entre o bacteriófago UFV-AREG1 e o fago T4 (principal representante do gênero *T4virus*) sugere que 39 genes do fago UFV-AREG1 não alinharam-se significativamente com os genes do fago T4, indicando que o genoma do fago UFV-AREG1 difere em 14 % dos genes presentes no genoma do fago T4. As proteínas diferencialmente expressas são majoritariamente proteínas sem função determinada ou conhecida até agora para o fago UFV-AREG1 e outros fagos, as quais correspondem a 30 das 39 proteínas (ORFs: 30, 32, 38, 44, 47, 49, 66, 80, 81, 93, 95, 96, 107, 108, 120, 129, 131, 208, 213, 227, 229, 230, 249, 262, 268, 270, 271, 272, 273 e 274). Em relação às proteínas estruturais, o fago UFV-AREG1 possui três proteínas estruturais que não estão no fago T4 (ORFs: 29, 221, 244), destacando a ORF 244 que corresponde ao receptor específico do hospedeiro presente no fago UFV-AREG1. Por último, em relação à diferença nos processos virais propriamente ditos, destacam-se seis proteínas no fago UFV-AREG1 que não estão presentes no fago T4. São as ORFs: 7, 42, 222, 266, 267

e 269, com destaque para as últimas quatro que correspondem a *Homing endonucleases*.

Os genes do fago UFV-AREG1 encontram-se distribuídos em ambas às fitas da cadeia dupla de DNA. Segundo as comparações realizadas no *Uniprot* (<http://www.uniprot.org/blast/>), os produtos de 161 genes (69%) do fago UFV-AREG1 compartilham similaridade com proteínas que possuem funções conhecidas e estão codificadas nos genomas de diferentes bacteriófagos pertencentes à ordem *Caudovirales*, anotados no *GenBank*. O fago UFV-AREG1 codifica no seu genoma aproximadamente 41% de proteínas hipotéticas, estas compartilham identidade com outras proteínas anotadas e codificadas no genoma de bacteriófagos da ordem *Caudovirales* e depositadas na base de dados do *UniProt*, no entanto, ainda não têm função definida nos processos de infecção viral e replicação do fago UFV-AREG1. O fago UFV-AREG1 apresentou sequências de proteínas com elevado grau de semelhança com outros bacteriófagos do tipo *T4virus*, que infectam o *Escherichia* e outras enterobactérias, tais como *Shigella* e *Yersinia*. A maioria das proteínas funcionais nomeadas que são altamente conservadas entre o fago UFV-AREG1 e os vírus do tipo *T4virus* estão relacionados a proteínas estruturais e ao processo de replicação. A análise das proteínas com função conhecida codificadas no genoma do fago UFV-AREG1 é apresentada na tabela 4.

Tabela 4: Características das “Open Reading Frames” (ORF’s) anotadas no genoma do fago UFV-AREG1.

<i>Locus</i>	Proteína	Posição	Fita	Massa molecular (Da)	Tamanho	Código Uniprot	<i>E-value</i>
AREG1_g001	rIIA	1..2178	-	82,794	725	G0X5C4_9CAUD	0.0
AREG1_g003	Topoisomerase II small subunit	2447..2979	-	18,630	160	TOPS_BPT4	1.9e-111
AREG1_g004	Homing Endonuclease	2960..3682	-	27,947	240	A0A023ZUM2_9CAUD	4.2e-176
AREG1_g005	DNA topoisomerase subunit	3756..5306	-	57,690	516	S5MKP1_9CAUD	0.0
AREG1_g007	Zinc ribbon domain protein	5670..5816	-	5,725	48	A0A0F6R6X3_9VIRU	7.4e-40
AREG1_g008	Putative RNA metabolism moderator	5819..6238	-	16,294	139	F2VX29_9CAUD	8.5e-90
AREG1_g009	Modifier of suppressor tRNAs	6238..6453	-	8,492	71	A0A097J3S9_BPR09	2.4e-53
AREG1_g010	Modifier of transcription	6626..7114	-	18,161	162	A0A097J6W4_BPT4	1.5e-109
AREG1_g013	Exonuclease A	8309..8992	-	25,950	227	A0A097J8H8_9CAUD	1.8e-165
AREG1_g016	ATP-dependent RecD-like DNA helicase	9494..10813	-	49,906	439	A0A0F6TIF3_9VIRU	0.0
AREG1_g018	Postulated decoy of host sigma70 or sigmaS	11123..11878	-	29,471	251	D4Z9G6_BPAR1	2.4e-173
AREG1_g019	RNA polymerase ADP-ribosylase	12001..12603	-	23,394	200	A0A023ZVR7_9CAUD	2.0e-141
AREG1_g020	Putative adenylylating enzyme	12600..13223	-	24,245	207	F2VX43_9CAUD	1.4e-142
AREG1_g024	Transcription modulator	14106..14291	-	7,410	61	A0A097J3U7_BPR09	2.9e-46
AREG1_g025	Transcription modulator under heat shock	14284..14769	-	18,286	161	Q06EV1_BPR32	4e-109
AREG1_g028	Small outer capsid protein	15424..15681	-	9,272	85	A0A097J5E2_BPR27	1.5e-66
AREG1_g029	Putative small outer capsid protein	15698..15907	-	7,977	69	A0A0M7QD68_9CAUD	6e-54
AREG1_g031	putative dCTP pyrophosphatase	16098..16616	-	20,217	172	F2VX54_9CAUD	2.7e-122
AREG1_g033	putative DNA primase	16885..17913	-	39,763	342	F2VX56_9CAUD	0.0
AREG1_g034	Major capsid domain-containing protein	17916..18080	-	5,901	54	A0A0A0PS78_9CAUD	1.7e-37
AREG1_g036	Spackle periplasmic protein	18451..18744	-	10,995	97	A0A097J729_BPT4	1.3e-62
AREG1_g038	Antitoxin Dmd	19064..19246	-	7,027	60	DMD_BPT4	3.8e-43
AREG1_g039	ATP-dependent helicase	19305..20732	-	53,615	475	VG41_BPT4	0.0
AREG1_g040	Putative head vertex assembly chaperone	20742..21080	-	13,062	112	A0A0A0PX98_9CAUD	2.7e-72

Cont. Características das “Open Reading Frames” (ORF’s) anotadas no genoma do fago UFV-AREG1							
AREG1_g041	RecA-like recombination protein	21073..22254	-	44,100	393	A0A097J8J3_9CAUD	0.0
AREG1_g042	Beta-glucosyl-HMC-alpha-glucosyl-transferase	22332..23174	-	32,424	280	A0A097J5I0_BPR27	0.0
AREG1_g043	Deoxycytidylate 5-hydroxymethyltransferase	23171..23911	-	28,557	246	A0A023ZUJ0_9CAUD	0.0
AREG1_g045	Immunity to superinfection membrane protein	24065..24316	-	9,372	83	A0A097J8L9_9CAUD	2.5e-62
AREG1_g048	DNA polymerase	25132..27828	-	103,576	898	A0A097J8K9_9CAUD	0.0
AREG1_g050	Translational repressor protein	28130..28498	-	14,591	122	A0A0A0PS89_9CAUD	1.7e-83
AREG1_g051	clamp loader subunit	28500..29063	-	21,380	187	K4FEI4_9CAUD	3.7e-130
AREG1_g052	Sliding-clamp-loader subunit	29065..30024	-	35,786	316	DPA44_BPT4	0.0
AREG1_g053	Sliding clamp DNA polymerase accessory protein	30074..30760	-	24,886	228	A0A097J8K2_9CAUD	2.2e-157
AREG1_g054	Putative RNA polymerase binding protein	30816..31205	-	14,712	129	F2VX77_9CAUD	1.8e-86
AREG1_g056	Recombination endonuclease subunit	31459..33099	-	61,756	546	A0A097J3W6_BPR09	0.0
AREG1_g059	Recombination-related endonuclease	33585..34604	-	39,150	339	I7LEX4_9CAUD	0.0
AREG1_g060	Alpha-glucosyltransferase	34781..35983	-	46,833	400	A0A023ZU18_9CAUD	0.0
AREG1_g065	RNA polymerase sigma fator	36921..37478	-	21,536	185	RP55_BPT4	9.6e-132
AREG1_g073	Glutaredoxin	39381..39902	-	19,847	173	A0A097J8P2_9CAUD	3.3e-69
AREG1_g074	Anaerobic NTP reductase small subunit	40018..40488	-	18,140	156	S5MKV1_9CAUD	6e-118
AREG1_g075	Anaerobic NTP reductase large subunit	40485..42302	-	68,044	605	A0A0M7QE16_9CAUD	0.0
AREG1_g076	Packaging and recombination endonuclease VII	42299..42772	-	18,144	157	A0A097J8N2_9CAUD	7.7e-112
AREG1_g077	Putative inhibitor of host Lon protease	42949..43434	-	18,958	161	F2VXA2_9CAUD	7.7e-114
AREG1_g082	Glutaredoxin 3	44275..44538	-	10,050	87	A0A0F6TII7_9CAUD	6.6e-58
AREG1_g089	Mur ligase domain-containing protein	49056..49463	-	15,416	135	A0A0A0PUH7_9CAUD	5.9e-93
AREG1_g090	Thioredoxin	49519..50046	-	20,773	175	I7LEY8_9CAUD	1.6e-120
AREG1_g092	AAA domain-containing protein	50511..51479	-	36,449	322	A0A0A0PU16_9CAUD	0.0
AREG1_g103	RI membrane protein antiholin	56175..56468	-	11,095	97	Q06EM1_BPR32	2.7e-62
AREG1_g105	Thymidine kinase	56736..57317	-	21,583	193	A0A097J8R6_9CAUD	4.6e-134
AREG1_g111	Valyl-tRNA synthetase modifier	58543..58884	-	12,908	113	A0A097J8T5_9CAUD	2.5e-73

Cont. Características das “Open Reading Frames” (ORF’s) anotadas no genoma do fago UFV-AREG1

AREG1_g112	endoribonuclease RegB domain-containing protein	58877..59422	-	20,695	181	A0A0A0PXE7_9CAUD	9e-128
AREG1_g113	Endoribonuclease	59430..59891	-	17,919	153	Q8H9K0_BPM1	4.8e-106
AREG1_g117	Autonomous glycy radical cofactor	60709..61071	-	13,849	120	D4Z9R9_BPAR1	1.5e-78
AREG1_g121	Putative internal head protein	62589..62894	-	11,774	101	A0A0A7HFA2_9CAUD	2.7e-23
AREG1_g122	Baseplate hub and tail lysozyme	62983..63477	-	18,578	164	I7B328_9CAUD	1.1e-112
AREG1_g123	Nudix hydrolase	63515..63955	-	16,958	146	K4FC00_9CAUD	1.1e-103
AREG1_g125	Putative membrane protein	64434..64796	-	14,116	120	A0A097J446_BPR09	2.9e-78
AREG1_g133	Homing endonuclease	69475..69858	-	14,308	127	A0A097J7A1_BPT4	1.6e-75
AREG1_g137	Ipl	71177..71464	-	10,177	95	A0A097J455_BPR09	1.4e-58
AREG1_g139	Chaperone for tail fiber formation	71992..72234	-	8,745	80	A0A097J797_BPT4	1.1e-55
AREG1_g140	Deoxynucleotide monophosphate kinase	72234..72947	-	26,872	237	A0A0M7Q968_9CAUD	5.7e-167
AREG1_g141	Tail completion and sheath stabilizer protein	72997..73527	-	19,712	176	Q06EI0_BPR32	7.8e-124
AREG1_g143	Head completion protein	74458..74910	-	17,588	150	G1FH72_9CAUD	1.4e-108
AREG1_g144	Baseplate wedge protein	74958..75548	+	23,025	196	A0A0F6TJL2_9VIRU	1.8e-142
AREG1_g145	Lysozyme	75532..77259	+	63,114	575	Q06EH6_BPR32	0.0
AREG1_g147	Phospholipase	77789..78082	+	10,231	97	G1FH76_9CAUD	4.7e-63
AREG1_g148	Baseplate wedge protein	78091..80073	+	74,388	660	I7AU40_9CAUD	0.0
AREG1_g149	Baseplate wedge initiator	80070..83168	+	119,144	1,032	I7A908_9CAUD	0.0
AREG1_g150	Baseplate wedge subunit	83161..84165	+	38,010	334	BP08_BPT4	0.0
AREG1_g151	Baseplate wedge protein	84229..85095	+	30,997	288	I6ZYA9_9CAUD	0.0
AREG1_g152	Baseplate wedge completion tail pin	85095..86900	+	66,269	601	D4Z9V8_BPAR1	0.0
AREG1_g153	Baseplate wedge protein	86900..87559	+	24,035	219	I7AU43_9CAUD	3.8e-151
AREG1_g154	Putative short tail fiber	87556..89106	+	55,450	516	A0A0A0PUN9_9CAUD	0.0
AREG1_g155	Putative fibrin neck whiskers	89116..90573	+	52,431	485	A0A0A0PSI6_9CAUD	0.0
AREG1_g156	Putative neck protein	90606..91535	+	34,689	309	F2VXL8_9CAUD	0.0
AREG1_g157	Neck protein	91537..92307	+	29,599	256	D9IEJ4_BPT4	0.0
AREG1_g158	Tail completion protein	92349..93167	+	31,573	272	COMPL_BPT4	0.0
AREG1_g159	Terminase small subunit	93176..93670	+	18,388	164	TERS_BPT4	4.5e-112
AREG1_g160	Terminase subunit	93654..95486	+	69,740	610	C3V1M6_9CAUD	0.0
AREG1_g161	Tail sheath protein	95518..97497	+	71,396	659	A0A097J7A8_BPT4	0.0
AREG1_g162	Portal vertex protein of head	97614..98105	+	18,462	163	I7AU53_9CAUD	1.4e-115
AREG1_g163	Portal vertex protein of head	98189..99763	+	61,006	524	A0A023ZV09_9CAUD	0.0

Cont. Características das “Open Reading Frames” (ORF’s) anotadas no genoma do fago UFV-AREG1							
AREG1_g164	Prohead core protein to internal peptides	99763..100002	+	8,992	79	A0A023ZW51_9CAUD	3.6e-44
AREG1_g165	Prohead assembly protein	100002..100427	+	15,887	141	GP68_BPT4	4.9e-90
AREG1_g166	Prohead core scaffold protein and protease	100427..101065	+	23,250	212	I7B359_9CAUD	9.6e-153
AREG1_g167	Putative prohead core scaffold protein	101096..101905	+	29,872	269	F2VXM9_9CAUD	3.3e-180
AREG1_g168	Major capsid protein	101924..103489	+	56,079	521	CAPSH_BPT4	0.0
AREG1_g169	Putative head vertex subunit	103573..104856	+	47,019	427	F2VXN1_9CAUD	0.0
AREG1_g170	Putative RNA ligase	104886..105890	-	37,554	334	F2VXN2_9CAUD	0.0
AREG1_g173	Putative large head outer capsid protein	106470..107600	-	40,803	376	F2VXN5_9CAUD	0.0
AREG1_g174	Minor capsid protein inhibitor of protease	107610..108290	-	25,551	226	Q06EE7_BPR32	8.1e-159
AREG1_g175	ATP-dependent DNA helicase	108341..110107	+	67,680	588	UVSW_BPT4	0.0
AREG1_g178	Recombination, repair and ssDNA binding protein	110583..110996	-	15,811	137	A0A097J8Y9_9CAUD	2.2e-91
AREG1_g179	Baseplate wedge protein	111063..111461	-	15,096	132	I7A936_9CAUD	4.8e-88
AREG1_g180	Baseplate protein	111461..112087	-	23,921	208	Q9G070_BPT6	6.7e-151
AREG1_g181	Baseplate hub assembly protein	112138..112890	+	29,457	250	A0A097J8Z0_9CAUD	0.0
AREG1_g182	Baseplate structural protein domain 1	112887..114059	+	44,276	390	A0A0F6R785_9CAUD	0.0
AREG1_g183	Baseplate hub distal subunit	114007..114540	+	20,048	177	A0A0F6TJ96_9CAUD	1e-124
AREG1_g184	Baseplate hub subunit tail length determinant	114537..116309	+	64,471	590	A0A097J905_9CAUD	0.0
AREG1_g185	Baseplate tail tube cap	116318..117412	+	39,769	364	K4FEU9_9CAUD	0.0
AREG1_g186	Baseplate tail tube initiator	117412..118377	+	34,875	321	K4FC27_9CAUD	0.0
AREG1_g188	ADP-ribosyltransferase exoenzyme	118757..120814	-	76,041	685	A0A0F6TIQ3_9CAUD	0.0
AREG1_g189	ADP-ribosyltransferase exoenzyme	120818..122911	-	77,866	697	A0A0F6TIX0_9CAUD	0.0
AREG1_g191	DNA ligase	123150..124613	-	55,288	487	A0A097J8Z9_9CAUD	0.0
AREG1_g201	Protein rIII	127978..128313	-	12,675	111	VR3_BPT4	4.5e-49
AREG1_g202	Capsid and scaffold protein	128461..128796	-	12,079	111	I6ZYE7_9CAUD	1.3e-74
AREG1_g205	Deoxycytidylate deaminase	129398..129979	-	21,227	193	A0A097J938_9CAUD	1.6e-141
AREG1_g212	3'-phosphatase,5'-polynucleotide kinase	131813..132721	-	34,855	302	G1FHE1_9CAUD	0.0
AREG1_g215	Outer membrane lipoprotein Rz1	133263..133562	-	11,629	99	A0A097J937_9CAUD	3.1e-67

Cont. Características das “Open Reading Frames” (ORF’s) anotadas no genoma do fago UFV-AREG1							
AREG1_g217	Inhibitor of host transcription	133903..134409	-	19,075	168	K4FCN5_9CAUD	2.8e-115
AREG1_g218	RNA ligase 1 and tail fiber attachment catalyst	134471..135595	-	43,436	374	D4ZA31_BPAR1	0.0
AREG1_g219	Endonuclease II	135648..136058	-	15,786	136	A0A097J925_9CAUD	1.3e-91
AREG1_g220	Ribonucleoside-diphosphate reductase 1 subunit beta	136086..137264	-	45,901	392	A0A0M7QEE1_9CAUD	0.0
AREG1_g221	Ribonucleoside-diphosphate reductase	137316..138275	-	86,031	754	A0A097J954_BPR51	0.0
AREG1_g222	Homing endonuclease	138296..139006	-	27,214	236	A0A0A0PU90_9CAUD	1.9e-152
AREG1_g223	Ribonucleoside-diphosphate reductase	139052..140485	-	54,479	477	A0A023ZVM7_9CAUD	0.0
AREG1_g226	Thymidylate synthase	141016..141876	-	33,001	286	Q6X185_9CAUD	0.0
AREG1_g228	Dihydrofolate reductase	142289..142870	-	21,718	193	A0A160CBH6_9CAUD	4e-132
AREG1_g234	Single-stranded DNA binding protein	144547..145452	-	33,506	301	A0A097J7N2_BPT4	0.0
AREG1_g235	Homing endonuclease	145502..146131	-	24,561	210	A0A097J4K1_BPR09	3.1e-154
AREG1_g236	Loader of DNA helicase and ssDNA binding	146133..146786	-	26,012	217	A0A097J941_9CAUD	2.2e-153
AREG1_g237	RNA polymerase-associated protein	146783..147121	-	12,831	112	VG33_BPT4	1.2e-70
AREG1_g238	Double-stranded DNA binding protein	147099..147368	-	10,379	89	DSBA_BPT4	7.5e-55
AREG1_g239	Ribonuclease H	147377..148294	-	35,558	305	RNH_BPT4	0.0
AREG1_g240	Putative long tail fiber proximal subunit	148398..152270	+	140,392	1,290	A0A0A0PUT8_9CAUD	0.0
AREG1_g241	Hinge connector of long tail fiber proximal connector	152279..153397	+	40,276	372	A0A023ZUK1_9CAUD	0.0
AREG1_g242	Putative hinge connector of long tail fiber distal connector	153460..154116	+	23,296	218	A0A0A0PXJ9_9CAUD	1.3e-155
AREG1_g243	Long tail fiber distal subunit	154125..156866	+	119,095	1,103	D4ZA54_BPAR1	0.0
AREG1_g244	Putative receptor recognition protein	156901..157680	+	26,077	259	A0A0A0PZN5_9CAUD	0.0
AREG1_g245	Holin	157711..158367	+	25,292	218	I7B3C6_9CAUD	1.7e-153
AREG1_g246	Anti-sigma factor A	158368..158640	-	10,590	90	A0A0F6TJC4_9CAUD	8e-55
AREG1_g248	Inhibitor of MrcBC restriction endonuclease	158802..159080	-	10,825	92	A0A023ZVP1_9CAUD	6.1e-58
AREG1_g254	Activator of middle period transcription	160460..161095	-	23,648	211	A0A097J955_9CAUD	7.2e-142

Cont. Características das “Open Reading Frames” (ORF’s) anotadas no genoma do fago UFV-AREG1							
AREG1_g256	DNA topoisomerase II medium subunit	161367..162695	-	50,495	442	A0A097J961_9CAUD	0.0
AREG1_g257	Acridine resistance protein	162847..162990	-	5,472	51	A0A097J7L5_BPT4	4.7e-28
AREG1_g258	Nucleoid disruption protein	163078..163533	-	16,900	151	F2VXJ9_9CAUD	2.7e-106
AREG1_g261	Inner membrane protein	164130..164243	-	4,252	37	A0A097J6Y4_BPR32	2.2e-28
AREG1_g263	Endonuclease IV	164826..165500	-	21,144	185	C3V1Y3_9CAUD	3.1e-133
AREG1_g266	Homing endonuclease	166850..167593	+	33,225	279	S5M362_9CAUD	3e-179
AREG1_g267	Homing endonuclease	167588..167764	-	30,123	256	A0A193H347_9CAUD	4.8e-18
AREG1_g269	Homing endonuclease	168720..169160	+	26,488	230	K4FK34_9CAUD	1e-83

A busca por elementos regulatórios no genoma do fago UFV-AREG1 revelou a presença de 40 promotores e dois terminadores independentes de *Rho* (Tabela 5). Entre os promotores bacterianos preditos, 11 foram encontrados na fita positiva do genoma do fago UFV-AREG1, regulando genes tardios, especificamente, do módulo de genes estruturais do fago UFV-AREG1. Os 29 promotores restantes encontram-se na fita negativa do genoma, iniciando a transcrição de genes necessários para dar início aos processos de infecção.

Tabela 5: Elementos regulatórios no genoma do fago de *Escherichia* UFV-AREG1.

Promotores					
ID	Sequência 5' → 3'	Início	Fim	Fita	Tamanho
p_3	TTTACTTTACCACAAGGATGTGGTATAAT	4604	4633	-	29
p_4	TTGACCATCTCAGTCGTCCTACTAAAAT	8261	8289	-	28
p_5	TTTACAAACTCTTGGGACCAGAATATAAT	9345	9374	-	29
p_14	TTTACATATCAAAATGAGTATGGTATAAT	17538	17567	-	29
p_15	TTGACCAAGCAGTTGATGGTGGTACAAT	17803	17831	-	28
p_17	TTGAAACTCAAATTTGAAGCGGATATTAT	20785	20813	-	28
p_19	TTTACAAGCTGACAAGACTATGGTATAGT	21462	21491	-	29
p_22	TTGAAGATGCCATGGATTGCGGGTATTAT	24986	25015	-	29
p_32	TCGACAGCGTGACTGAAGCGGTTAATAAT	31752	31782	+	30
p_40	TTTACAAATCTATCAGTACGTGTTATAGT	36012	36041	-	29
p_44	TTTACATTGACGATGATTTTGATTATAAT	41000	41029	-	29
p_45	TTTACAACAAGTTCAAACCGTGGTATTAT	41439	41468	-	29
p_46	TTTACACTGATGAAGAAACAGTATATAAT	45661	45690	-	29
p_51	TTTACTTTGCCACAAGGATGTGGTATAAT	49281	49310	-	29
p_59	TTTACTTCTGCCGCAAAGCATATTATAAT	54325	54354	-	29
p_62	TTGACGCAAGAAGACGATATGCTATATT	56837	56865	-	28
p_63	TTTACAAGTTGGCAAGGTTATGGTATAGT	57099	57128	-	29
p_68	TTTACATACTCTCTAACTTCAGAATATGAT	60982	61012	+	30
p_69	TTTACTTTTCCTCTTGACTGTGGTATAAT	62105	62134	-	29
p_70	TTGACACTGTACACTGCTGCTGTAATAT	63649	63677	-	28
p_71	TTGACAGGCTCGTCAATTATATACAAAAT	63712	63741	+	29
p_73	TTAACTTAGCTAAAAGTAAATGGTATAAT	65244	65273	-	29
p_77	TTGAAAAATATATGCACAGCATTTATAAT	70648	70677	-	29
p_83	TTGACGAGTATCAGGAACGATATAATAAT	74612	74641	+	29
p_86	TTGACATCACGATTTTCAGTTTGGCTATTAT	75332	75362	+	30
p_105	TTGACGAGTTTGCGCAACAGTAGATAAT	90317	90345	-	28
p_110	TTGACAACAACATAAGGTTCAACATATTCT	94409	94439	-	30
p_111	TTTACATTTAGTTGATTTTAGCTATAAT	94762	94790	+	28

Cont. **Elementos regulatórios no genoma do fago de Escherichia UFV-AREG1**

p_127	TTGACACTGTAATCAAAGACTGCAGAAT	106398	106426	-	28
p_129	TTGACCGGCAGGTCCTTTTAACACATAAT	109598	109627	+	29
p_132	TTGACCTATTAAGTTGGCTCACCTACAAT	115706	115736	-	30
p_135	TTGAAGGGCTTGGAAGTGTCTTTATAAT	117663	117692	+	29
p_136	TTGACTCCGCGCTCAACAGAAGATTTAAT	119134	119163	+	29
p_139	TTTACAAGTCCCTCGTATTGTGTTATAGT	120914	120943	-	29
p_145	TTGACGATTGAGCAGAGCGTCAATAGAAT	127575	127604	+	29
p_149	TTGACATGAAGCATTGGAAAGTAGTAAAAT	129514	129544	-	30
p_163	TCGACAGATTTTCATTACCAACTCCTATTAT	142046	142076	-	30
p_196	TTGACAGAACAACACTATGAGGAAGAAT	164336	164365	+	29
p_197	TTGAAAATCGTGCTATTCCAAATATGAT	164783	164811	-	28
p_199	TTTACAAGACTGTTCTCTGTGGTACTAT	166457	166486	-	29

Terminadores independentes de Rho

t1	TGACTTAATAGCGCGGGTAAAACCCGCGTTTCTAAATTTAA	3714	3755	-	42
t2	GAATAAATCTAGGGACCTCCGGGTCCCTTTTTCATACAAG	22799	22828	-	40

Ambas as sequências terminadoras se encontram localizadas na fita negativa do genoma do fago UFV-AREG1. A primeira encontra-se após o gene que codifica a DNA topoisomerase, proteína que é responsável pelo controle dos estados topológicos do DNA, separando a cadeia dupla e preparando-o para o processo de replicação do genoma viral. A segunda está situada após o gene que codifica a DNA polimerase, enzima essencial para os processos de replicação viral. O baixo número de sequências terminadoras independentes de *Rho* em relação ao grande número de genes identificados no genoma do fago UFV-AREG1, sugere a existência de outros tipos de terminadores e a geração de mRNAs policistrônicos (ELLER et al., 2014). Este tipo de RNA mensageiro codifica a sequência de aminoácidos de duas ou mais cadeias polipeptídicas de genes estruturais adjacentes.

A anotação das ORF's preditas no genoma do bacteriófago UFV-AREG1 e sua classificação funcional, assim como a disposição de seus elementos regulatórios, permitiu a determinação de uma organização em dois clusters funcionais (Figura 2).

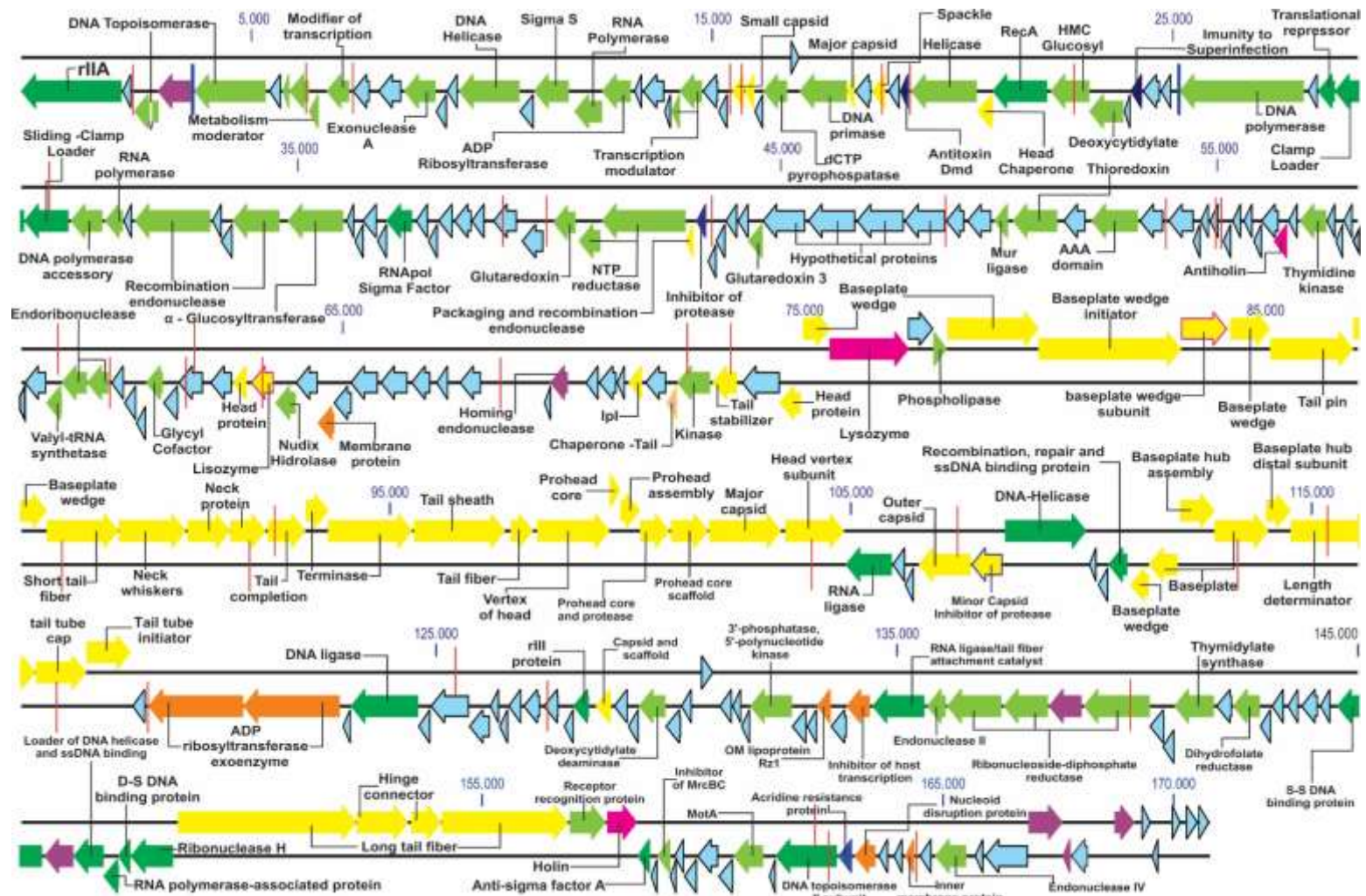


Figura 2: Organização do genoma do fago UFV-AREG1. Linhas transversais vermelhas e azuis denotam seqüências de promotores e terminadores independentes de Rho, respectivamente. Setas na cor roxa correspondem às Homing endonucleases; na cor azul a proteínas hipotéticas; na cor verde indicam genes relacionados ao metabolismo, e as amarelas genes relacionadas à estrutura viral.

Cluster genômico 1: Processos de replicação do genoma

Este cluster consta de 111 ORF's que codificam proteínas que constituem a maquinaria dos processos de replicação do genoma do fago UFV-AREG1 e que se encontram distribuídos na maioria no genoma na fita negativa na Figura 2. O genoma do fago UFV-AREG1 é aberto pela proteína rIIA, esta é típica dos bacteriófagos com atividade lítica. O genoma dos bacteriófagos do tipo T4 têm a sua abertura do genoma com a proteína rIIA e a evidência sugere que proteínas do tipo rII não estão relacionadas diretamente aos processos de inibição de lise celular, pelo contrário, quando elas estão ausentes, desenvolve-se uma rota alternativa para o processo de lise celular que depende da presença de genes de alguns dos possíveis profagos (PADDISON, 1998).

A proteína rIIA pode ser importante na replicação viral, desde que seja encontrada em complexos que carregam diferentes enzimas que sintetizam deoxiribonucleótidos e associadas com o DNA e a membrana do hospedeiro, tal como é observado no esquema representativo do genoma do fago UFV-AREG1. Além disso, pode ser requerida para manter a integridade da membrana do hospedeiro durante o processo de infecção e replicação (<http://www.uniprot.org/uniprot/P03690>).

Além do gene que codifica a proteína rIIA, entre os genes relacionados principalmente ao processo de replicação pertencentes a este cluster é importante destacar a ORF 13 que codifica a Exonuclease A; ORF 19 e ORF 41 que codificam RNA polimerase e RecA, respectivamente. Outras proteínas importantes nos processos de replicação do DNA e que estão presentes no genoma do fago UFV-AREG1 são DNA polimerase, DNA helicase, DNA ligase e a DNA topoisomerase II codificadas nas ORF's 48, 175, 191 e 256, respectivamente. Em relação a DNA helicase (ORF 175) é importante destacar que a esta se encontra na fita positiva do genoma do fago UFV-AREG1, o qual não é muito comum por se tratar de um gene diretamente relacionado aos processos de replicação viral.

O Genoma do fago UFV-AREG1 codifica na sua ORF 45 a proteína "*Inmunity to Superinfection*" que tem a função de evitar que o genoma do fago seja ejetado do

citoplasma celular. Esta proteína é responsável por impedir a infecção da bactéria por outros bacteriófagos da mesma família e que reconhecem os receptores celulares da superfície bacteriana (LU e HENNING, 1989).

Neste cluster também podemos encontrar genes relacionados ao metabolismo do vírus e aos processos de transcrição e tradução, que auxiliam na replicação do genoma. O genoma do fago UFV-AREG1 possui sete *homing endonuclease*, o que sugere a presença de *introns* no genoma deste fago, que serão confirmadas futuramente.

O genoma do fago UFV-AREG1 inclui as ORF's 56 e 59 que codificam duas unidades de "*Recombination endonuclease*" separadas por duas proteínas sem função conhecida. As ORF's 56 e 59 possuem um tamanho de 1640 e 1019 bp, respectivamente. Estas proteínas possuem funções específicas na replicação do genoma viral e degradação do DNA do hospedeiro, também na supressão da expressão gênica do hospedeiro pela ação do vírus (KUTTER e WIBERG, 1968).

A DNA topoisomerase, que desempenha diversas funções importantes nos processos de replicação do DNA, se encontra no genoma do fago UFV-AREG1 de forma fragmentada em duas subunidades (ORF's 3 e 5) separadas por uma *homing endonuclease*. A ORF de menor tamanho (ORF 3) se encontra regulada por um promotor, como pode ser observado na figura 2.

Cluster genômico 2: Proteínas estruturais e associadas a processos de lise celular

Este *cluster* é constituído por 50 ORF's e corresponde ao *cluster* estrutural, neste se encontram genes que codificam proteínas que conformam a estrutura viral, tais como capsídeo, cauda e cabeça. Esses genes estão distribuídos entre as ORF's 144 a 169, 181 a 186 e 208 da fita positiva do genoma do fago UFV-AREG1 (Figura 2).

Os genes pertencentes a este *cluster* estão diretamente relacionados aos processos de lise após montagem do vírus, maturação do DNA e da saída das

partículas virais. Este *cluster* pode ser diferenciado na figura 2 como os genes marcados na cor amarela. Estes genes encontram-se distribuídos em ambas as fitas, majoritariamente na fita positiva do genoma do fago UFV-AREG1 e são os genes que podem ser denominados como genes tardios. A maioria dos genes que acomodam este *cluster* possui função conhecida ou codificam proteínas com função biológica estabelecida.

Alguns genes estruturais deste cluster se encontram na fita negativa (ORF's 28, 29, 34, 36, 40, 139, 141, 143, 173, 174, 179, 180 e 202) e são expressos de forma paralela aos eventos de replicação e metabolismo viral dependente do hospedeiro.

Outros genes destacados na cor laranja no mapa do genoma são aqueles relacionados aos processos de lise de forma direta, à defesa do hospedeiro e à aquisição de genes de resistência. Os genes destacados na cor magenta correspondem às duas principais proteínas envolvidas na lise celular. No genoma encontram-se duas lisozimas. A primeira apresentada (ORF 122) está relacionada ao processo de infecção do bacteriófago e à primeira degradação do peptidoglicano para permitir a entrada do material genético viral no hospedeiro. A segunda lisozima (ORF 145) é uma endolisina com atividade de degradação do peptidoglicano e participa com a Holina (ORF 245, fita positiva) nos eventos sequenciais que conduzem à lise programada do hospedeiro para a liberação das partículas virais maduras. A holina é responsável por permeabilizar a membrana celular do hospedeiro e por sinalizar a saída da endolisina até o espaço periplásmico para o encontro com o peptidoglicano e a sua posterior degradação, facilitando a liberação da progênie viral (LEIMAN et al., 2010). A presença da Antiholina (ORF 103) na fita negativa do genoma do fago UFV-AREG1 indica que a holina é fortemente regulada.

Os genes destacados na cor laranja no mapa do genoma UFV-AREG1 estão relacionados à proteção dos processos de replicação de forma geral para evitar que alguma ação por parte do hospedeiro interrompa o processo de replicação do genoma viral, a montagem do vírus propriamente dito e a lise celular que finalizaria com a morte do micro-organismo. No bacteriófago UFV-AREG1 não foram

detectados genes relacionados à lisogenia, o que indica que este é um fago lítico com potencial de uso no biocontrole de *E. coli* O157:H7.

Presença de tRNAs no bacteriófago UFV-AREG1

A partir da avaliação da presença de tRNAs foram encontrados oito tRNAs distribuídos no genoma do fago UFV-AREG1, como indica a Tabela 6. O número de tRNAs que o fago T4 codifica coincide com o número de tRNAs do fago UFV-AREG1 (COMEAU et al., 2007). A função exata dos tRNAs codificados por bacteriófagos que infectaram as células bacterianas ainda não é muito clara. Estes elementos do genoma podem estar envolvidos com a adaptação ao sistema de tradução do hospedeiro e à demanda de padrão de uso de códons pelo fago (MOSIG, 1994) ou, à extinção rápida da tradução específica do hospedeiro após a infecção fágica (MILLER et al., 2003).

Uma possível função dos tRNAs no genoma do fago pode ser a de permitir maior eficiência de tradução de certos genes dos fagos, muitas vezes daqueles que não são essenciais e que têm usos de códons diferentes (KUNISAWA, 1992). Os genes implicados na interação com a célula hospedeira, tais como as fibras da cauda, os tRNAs, as bases modificadas, etc. São muito mais variáveis e frequentemente localizados nas regiões hiperplásicas do genoma (COMEAU et al., 2007).

Tabela 6. Genes tRNA e uso de códons do fago UFV-AREG1

tRNAs ID	tRNA	Anticódon	Posição	Tamanho (bp)	GC (%)	Uso de Códon
AREG1t	Arg	TCT	169204...169280	77	48,1	+
AREG2t	Gln	TTG	70142...70070	73	45,2	-
AREG3t	Leu	TAA	70068...69982	87	47,1	-
AREG4t	Gly	TCC	69975...69902	74	43,2	-
AREG5t	Pro	TGG	69310...69237	74	50,0	-
AREG6t	Ser	TGA	69234...69148	87	57,5	-
AREG7t	Thr	TGT	69145...69070	76	50,0	-
AREG8t	Tyr	GTA	69982...68896	87	55,2	-

Análise filogenética

A análise filogenética das sequências genômicas dos bacteriófagos revela que o fago UFV-AREG1 foi incluído em um clado monofilético com os bacteriófagos HY01 (*Escherichia*) e PSs1 (*Shigella*), apontando que além desses bacteriófagos, possuem um ancestral em comum (Figura 3) ou o espectro lítico dos mesmos pode ser amplo, indicando promiscuidade do bacteriófago UFV-AREG1.

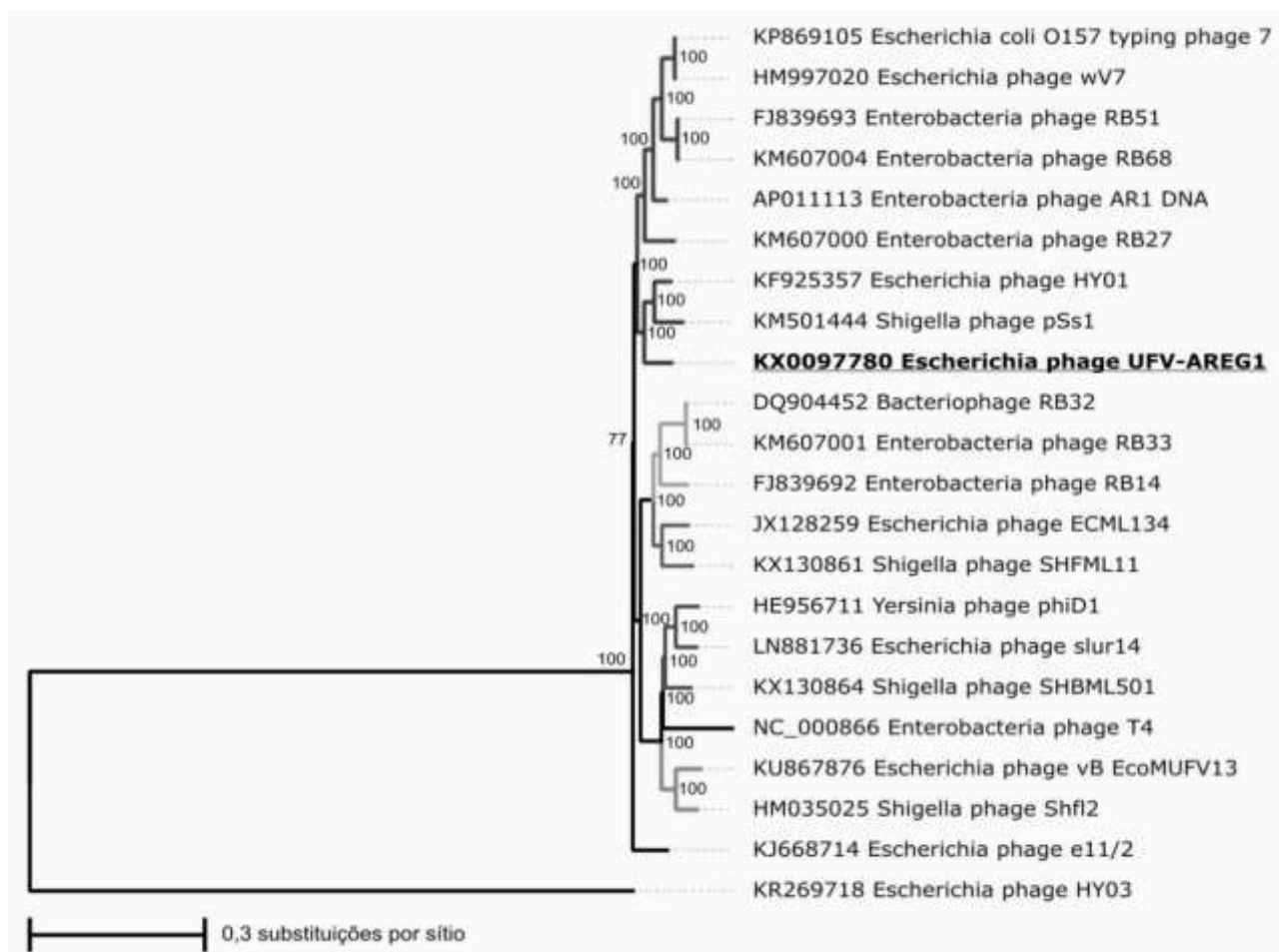


Figura 3: Análise filogenética do genoma do fago UFV-AREG1. A árvore filogenética foi obtida por inferência bayesiana usando o software MrBayes. A análise filogenética foi executada usando o método Bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC) em duas corridas com 1.000.000 de gerações. Os valores de probabilidade posterior (expressos em porcentagem) calculados a partir das melhores árvores amostradas pelo software MrBayes estão representados ao lado de cada nó da árvore filogenética.

Os clados agrupam bacteriófagos com especificidade por hospedeiros diferentes (ou com a possibilidade de reconhecer receptores celulares similares para

processos de infecção), mas com genomas conservados. A conservação dos genomas foi confirmada com o alinhamento dos genomas e a matriz de identidade (Figura 4), obtidas durante a análise filogenética. Na figura e na matriz pode-se observar a conservação dos genomas, o que confirma a classificação taxonômica sugerida previamente.

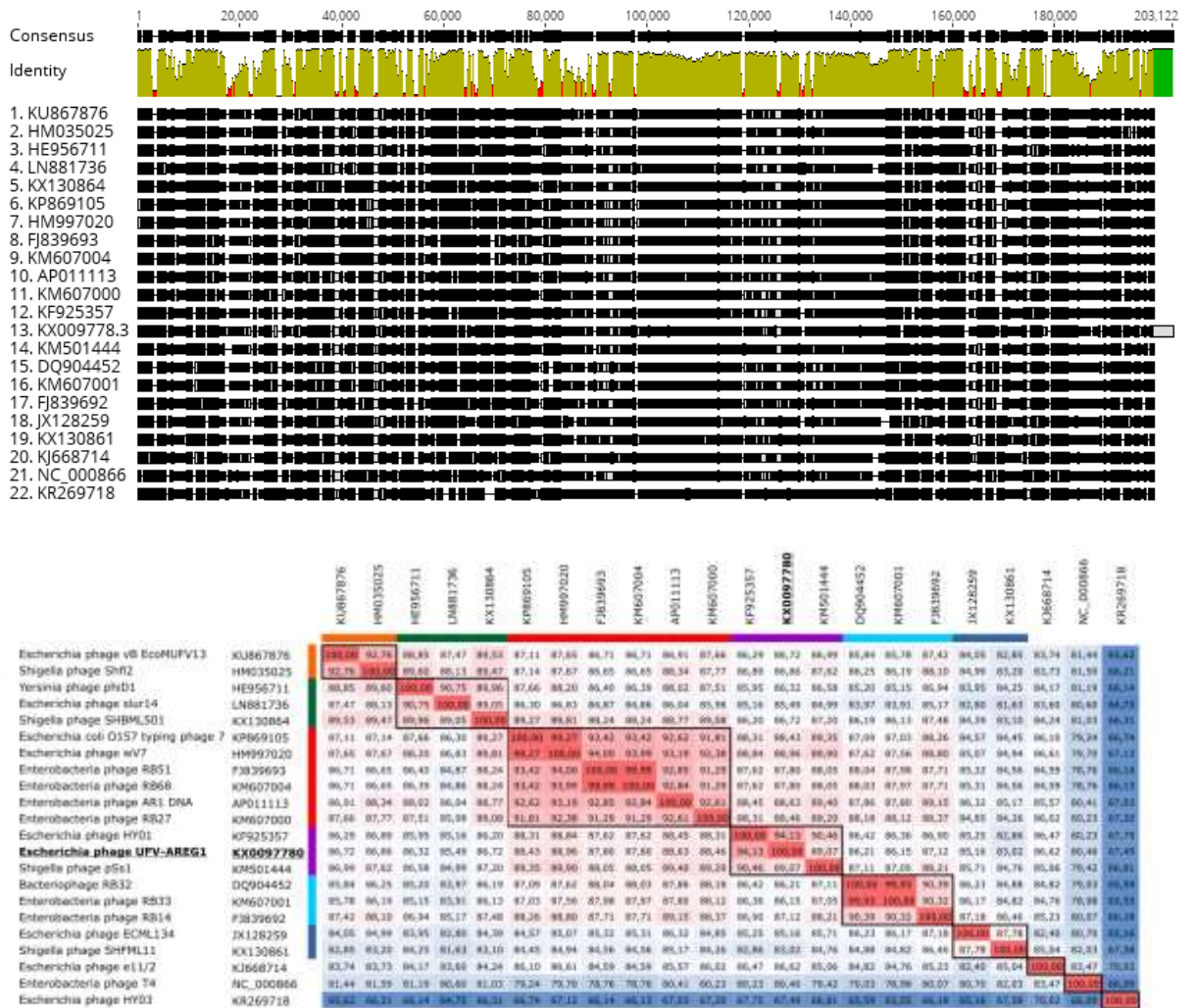


Figura 4: alinhamento dos genomas e matriz de identidade destes, obtidos na análise filogenética do fago UFV-AREG1 pelo software MrBayes, sugerindo que a diversidade entre os genomas dos fagos analisados é realmente baixa.

Os bacteriófagos analisados na filogenia possuem tamanho de genoma, densidade gênica e conteúdos G+C similares. Os bacteriófagos PEC04, vB_EcoM-UFV13, Phage 7 e HY03, que não têm classificação sugerida dentro do gênero *T4virus*, poderiam portanto, segundo a tabela 1, ser inseridos dentro desta classificação taxonômica, pois compartilham muitas características genômicas do gênero.

CONCLUSÕES

O gênero *T4virus* é constituído por um amplo grupo de bacteriófagos específicos de *Escherichia* com um elevado grau de identidade na sequência de nucleotídeos. No presente trabalho foi apresentada a anotação do genoma do fago UFV-AREG1 que tem sido estudado para aplicações de biocontrole e identificação de *Escherichia coli* O157:H7. De acordo com os resultados da análise do genoma, das características morfológicas e da análise filogenética, o fago UFV-AREG1 pode ser classificado dentro do gênero *T4virus*, apresentando um genoma similar ao do fago *Escherichia* phage HY01, com características conservadas presentes em outros bacteriófagos que infectam a *Escherichia coli* e diferenças genômicas com o fago T4 em aproximadamente 39 produtos proteicos.

O bacteriófago UFV-AREG1 possui dois *clusters* funcionais claramente definidos. Assim, foi identificado um *cluster* de genes precoces relacionados aos processos de replicação e metabolismo, e um segundo cluster correspondente a genes tardios que codificam proteínas estruturais do vírus que estão relacionadas aos processos de lise celular. No genoma deste fago também foram identificados elementos regulatórios do tipo promotor bacteriano e terminadores independentes de *Rho*, assim como oito tRNAs. A análise filogenética realizada sugere uma possível variabilidade no espectro de ação do fago UFV-AREG1, indicando a promiscuidade deste sobre bactérias, tais como *Yersinia* e *Shigella*.

Conhecer a composição e organização do genoma do fago UFV-AREG1 permite explorar outras oportunidades de uso. Os resultados obtidos garantem

segurança nas aplicações deste fago, pois foram descartados genes relacionados à lisogenia, evitando possíveis problemas de transferência horizontal de genes aos hospedeiros com potencial de ação. Finalmente é necessário determinar a presença de introns e mRNAs no genoma do fago UFV-AREG1, assim como a possível presença de outros elementos móveis.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW, LIPMAN DJ (1990) Basic local alignment search tool. **J Mol Biol** 215:403–410. doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2), 1990.
- BATALHA, L. S. (2017). Encapsulamento de bacteriófagos em diferentes matrizes e avaliação do potencial para a fagoterapia. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). **Universidade Federal de Viçosa**, Brasil. 2017.
- BOGGIONE, D. M., BATALHA, L. S., GONTIJO, M. T., LOPEZ, M. E., TEIXEIRA, A. V., SANTOS, I. J., & MENDONÇA, R. C. Evaluation of microencapsulation of the UFV-AREG1 bacteriophage in alginate-Ca microcapsules using microfluidic devices. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 158, 182-189, 2017.
- COMEAU, A. M., BERTRAND, C., LETAROV, A., TÉTART, F., & KRISCH, H. M. Modular architecture of the T4 phage superfamily: a conserved core genome and a plastic periphery. **Virology**, 362(2), 384-396, 2007.
- DARRIBA, D., TABOADA, G. L., DOALLO, R., & POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature methods**, 9(8), 772, 2012.
- ELLER, M. R., VIDIGAL, P. M., SALGADO, R. L., ALVES, M. P., DIAS, R. S., DA SILVA, C. C & DE PAULA, S. O. UFV-P2 as a member of the *Luz24likevirus* genus: a new overview on comparative functional genome analyses of the LUZ24-like phages. **BMC genomics**, 15(1), 7, 2014.
- HYATT, D.; CHEN, G.-L.; LOCASCIO, P. F.; LAND, M. L.; LARIMER, F. W.; HAUSER, L. J. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. **BMC bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 119, 8 jan. 2010.
- JAFARI, A.; ASLANI, M. M.; BOUZARI, S. Escherichia coli: a brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. **Iranian journal of microbiology**, v. 4, n. 3, p. 102-117, 2012.

KUNISAWA, T., Synonymous codon preferences in bacteriophage T4: a distinctive use of transfer RNAs from T4 and its host *Escherichia coli*. **J. Theor. Biol.** 159, 287–298, 1992.

KUTTER, E. M., & WIBERG, J. S. Degradation of cytosine-containing bacterial and bacteriophage DNA after infection of *Escherichia coli* B with bacteriophage T4D wild type and with mutants defective in genes 46, 47 and 56. **Journal of molecular biology**, 38(3), 395-411, 1968.

LEE, H., KU, H. J., LEE, D. H., KIM, Y. T., SHIN, H., RYU, S., & LEE, J. H. Characterization and Genomic Study of the Novel Bacteriophage HY01 Infecting Both *Escherichia coli* O157: H7 and *Shigella flexneri*: Potential as a Biocontrol Agent in Food. **PloS one**, v. 11, n. 12, e0168985, 2016.

LEIMAN, P. G., ARISAKA, F., VAN RAAIJ, M. J., KOSTYUCHENKO, V. A., AKSYUK, A. A., KANAMARU, S., & ROSSMANN, M. G. (2010). Morphogenesis of the T4 tail and tail fibers. **Virology journal**, 7(1), 355.

LIAO, W. C., NG, W. V., LIN, I. H., SYU, W. J., LIU, T. T., & CHANG, C. H. (2011). T4-like genome organization of the *Escherichia coli* O157: H7 lytic phage AR1. **Journal of virology**, 85(13), 6567-6578.

LOPEZ, M. E. S. Bacteriófagos para Biocontrole De *Escherichia coli* enterohemorrágica. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). **Universidade Federal de Viçosa**, Brasil. 2013.

LOPEZ, M. E. S., BATALHA, L. S., VIDIGAL, P. M. P., ALBINO, L. A. A., BOGGIONE, D. M. G., GONTIJO, M. T. P., BAZZOLLI, D. M. S., MENDONCA, R. C. S. Genome sequence of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* bacteriophage UFV-AREG1. **Genome announcements**, 4(5), e00412-16, 2016.

LOWE, T.M. AND CHAN, P.P. tRNAscan-SE On-line: Search and Contextual Analysis of Transfer RNA Genes. **Nucl. Acids Res.** 44: W54-57, 2016.

LU, M. J., & HENNING, U. The immunity (imm) gene of *Escherichia coli* bacteriophage T4. **Journal of virology**, 63(8), 3472-3478, 1989.

MILLER, E. S., KUTTER, E., MOSIG, G., ARISAKA, F., KUNISAWA, T., & RÜGER, W. Bacteriophage T4 Genome. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 67(1), 86–156, 2003.

MOSIG, G. Synthesis and maturation of T4-encoded tRNAs. **Molecular biology of bacteriophage**, 4, 182-185, 1994.

PADDISON, P., ABEDON, S. T., DRESSMAN, H. K., GAILBREATH, J. T., MOSSER, E., NEITZEL, J., GUTTMAN, B., KUTTER, E.. The roles of the bacteriophage T4 genes in lysis inhibition and fine-structure genetics: A new perspective. **Genetics**, v. 148, p. 1539-1550, 1998.

RONQUIST, F., TESLENKO, M., VAN DER MARK, P., AYRES, D. L., DARLING, A., HÖHNA, S. & HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic biology**, 61(3), 539-542, 2012.

WHO, World Health Organization, disponivel em: <http://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>, 2017.

6. Capítulo 3

Determinação do potencial do fago UFV-AREG1 como agente de biocontrole de *E. coli* O157:H7 na indústria de alimentos

RESUMO: O presente trabalho teve como objetivo a caracterização do fago UFV-AREG1 em relação ao seu espectro lítico de ação e resistência a diferentes condições de temperatura, pH, exposição à luz UV e fluorescente e frente a substâncias sanitizantes utilizadas com frequência na indústria de alimentos. Também foram avaliados os parâmetros de cinética de crescimento do bacteriófago e a forma como este afeta a expressão proteica em *E. coli* O157:H7, após infecção. Este bacteriófago é capaz de atingir concentrações de até 10^{12} UFP.mL⁻¹ tendo como potencial hospedeiro *E. coli* O157:H7 e outras estirpes de *E. coli* testadas neste trabalho. As ferramentas bioinformáticas também permitiram a predição de possíveis hospedeiros. Esta análise, além de confirmar a ação sobre *E. coli*, sugeriu a ação sobre *Shigella flexneri* e *Yersinia pestis*. O fago UFV-AREG1 não apresentou perda significativa da viabilidade nas temperaturas de 7 e 25 °C durante 14 dias de armazenamento, indicando que nas temperaturas avaliadas o bacteriófago UFV-AREG1 pode ser utilizado por um período de até 14 dias sem perdas importantes na concentração e na atividade lítica sobre *E. coli* O157:H7. A atividade fágica também foi mantida em soluções com pH acima de 3,4, condição da maioria dos alimentos em que *E. coli* O157:H7 pode ser encontrada. Sanitizantes como o peróxido de hidrogênio e o dicloroisocianurato de sódio não foram capazes de inativá-lo, mas o ácido per-acético inviabilizou o fago UFV-AREG1 após 15 minutos de exposição. O fago UFV-AREG1, quando exposto à luz UV, pode perder até uma unidade logarítmica na concentração a cada 5 minutos de exposição, enquanto a exposição à luz fluorescente não causou qualquer efeito sobre os bacteriófagos. O fago UFV-AREG1 é capaz de gerar até 18 novas partículas virais por cada ciclo de infecção, tendo uma duração aproximada de 60 minutos. Todos estes parâmetros foram avaliados para determinar a estabilidade do fago UFV-AREG1 em diferentes

condições que podem estar presentes na indústria de alimentos, assim como seu potencial de encapsulação e a posterior necessidade do uso de embalagens.

INTRODUÇÃO

Escherichia coli O157:H7 é um patógeno associado a alimentos conhecido por gerar diversos sintomas tais como: dores abdominais, diarreia, colite hemolítica e a Síndrome Urêmica Hemolítica (SHU) com uma baixa dose infecciosa, estimada entre 10^1 e 10^2 células (GYLES, 2007). Embora os antibióticos representem, até então, o tratamento mais efetivo contra essa e outras bactérias patogênicas, o surgimento de estirpes resistentes tem levado ao estrito controle sobre o uso de antibióticos e de conservantes químicos na indústria de alimentos (LEE et al., 2016). Agentes de biocontrole naturais para a conservação dos alimentos são alternativas para a prevenção e controle de patógenos nessas matrizes. Entre estes agentes de biocontrole alternativos encontram-se os bacteriófagos, amplamente conhecidos pela capacidade de infetar bactérias e aproveitar seus recursos energéticos e metabólicos para a replicação viral, abrindo o cardápio de possibilidades para o biocontrole de bactérias patogênicas, especificamente na indústria de alimentos.

O uso de diversos bacteriófagos para uso na indústria de alimentos tem sido aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o controle de patógenos veiculados em matrizes alimentícias. Entretanto, para que possam ser utilizados de forma eficiente eles precisam cumprir requisitos específicos, como: proporção de bacteriófagos/bactérias, parâmetros cinéticos de crescimento de bacteriófagos, fatores físico-químicos (pH, temperatura, salinidade e outros) e acessibilidade às bactérias e segurança na aplicação (LY-CHATAIN, 2014).

Com a finalidade de desenvolver novos produtos que auxiliem na segurança microbiológica de alimentos, o bacteriófago UFV-AREG1 foi isolado a partir de água residuária de estábulo utilizando *E. coli* como hospedeiro, apresentando grande capacidade de infecção em algumas estirpes patogênicas da espécie, tal como *E.*

coli O157:H7. De acordo com a morfologia, este fago foi classificado na Ordem *Caudovirales* e na Família *Myoviridae*, também teve seu genoma sequenciado e anotado, apresentando um genoma linear dsDNA de 170.788 bp com 274 ORFs (LOPEZ et al., 2016). Neste trabalho foram avaliadas condições de estabilidade que viabilizem o uso do bacteriófago UFV-AREG1 no controle de *E. coli* O157:H7 em alimentos.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Microbiologia de Patógenos de Origem Alimentar e Hídrico (LAMPOAH), do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG. As estirpes utilizadas foram doadas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). A estirpe *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895) foi utilizada como hospedeira no processo de propagação dos bacteriófagos. O bacteriófago UFV-AREG1 previamente isolado pertencente ao banco de bacteriófagos do LAMPOAH (LOPEZ, 2013).

Propagação e avaliação da especificidade do bacteriófago: O fago UFV-AREG1 foi propagado em *E. coli* O157:H7, segundo metodologia adaptada por Kudva et al. (1999). Sobre as placas de Petri com lises foram adicionados 10 mL de solução tampão SM modificado (0,1 M NaCl; 0,01 M MgSO₄•7H₂O; 0,05 M Tris-Cl, pH = 7,5). As placas foram incubadas a 17 °C sob agitação de 100 rpm por 24 horas. Após este período a suspensão foi centrifugada a 13.000 x g por 5 minutos para diminuir a quantidade de células bacterianas em suspensão. Em seguida a suspensão foi filtrada em membrana de acetato de celulose com poro de 0,22 µm. O filtrado foi armazenado em tubo de ensaio esterilizado e mantido sob-refrigeração para posterior titulação e análise microscópica.

A especificidade do bacteriófago UFV-AREG1 foi avaliada sobre as estirpes relacionadas na Tabela 1, utilizando a técnica de microgotas em superfície. Assim, 10 µL da suspensão de bacteriófagos foram misturados em 5 mL de BHI semissólido (0,7%), essa mistura foi depositada sobre a superfície do ágar BHI contendo a

bactéria, a testar, na concentração de 10^8 UFC·mL⁻¹. As placas foram incubadas a 37 °C por 12 horas. Foram consideradas positivas as placas que, após incubação apresentaram halos ou placas de lise nas placas de crescimento bacteriano.

Tabela 1: Especificidade do bacteriófago UFV-AREG1.

Estirpe	Código	Presença de lise
<i>Salmonella</i> Enteritidis	13076	-
<i>Salmonella</i> Typhi	6539	-
<i>Salmonella</i> Cholerasius	10708	-
<i>E. coli</i>	11229	+
<i>E. coli</i> O111ab	CDC O11ab	+
<i>E. coli</i>	23229	+
<i>E. coli</i> O86:H35 (EPEC*)	CDC O86:H35	-
<i>P. aeruginosa</i>	25619	-
<i>P. fluorescens</i>	NCTC 10038	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	6538	-

(-) Resultado de lise negativo; (+) Resultado de lise positivo.

* (EPEC) *E. coli* enteropatogênica.

Avaliação da estabilidade do bacteriófago UFV-AREG1

Viabilidade dos bacteriófagos em temperatura ambiente e de refrigeração:

Suspensões com 10^8 UFP·mL⁻¹ do fago UFV-AREG1 em tampão SM foram estocadas em microtubos sob temperatura de refrigeração ($7,0 \pm 0,5$ °C) e em temperatura ambiente ($25,0 \pm 0,5$ °C). A viabilidade dos bacteriófagos foi então avaliada nos tempos de 0, 1, 2, 4, 7 e 14 dias por meio de uma contagem do número de halos ou placas de lise em *E. coli* O157:H7 semeada em ágar BHI.

Viabilidade dos bacteriófagos em luz ultravioleta (UV) e fluorescente:

Suspensões com aproximadamente 10^8 UFP·mL⁻¹ de bacteriófagos UFV- AREG1 em tampão SM foram expostas a luz ultravioleta (G20TB, Starlux) a uma distância de 50 cm, a estabilidade dos bacteriófagos foi verificada durante 0, 5, 10 e 15 minutos. A estabilidade dos bacteriófagos em recipiente translúcido sob a luz fluorescente (T5, Empalux) foi determinada a uma distância de 185 cm nos tempos

de 0, 7 e 14 dias por meio da contagem do número de halos ou placas fágicas em cultura de *E. coli* O157:H7 em ágar BHI.

Viabilidade de bacteriófagos em diferentes valores de pH: A viabilidade do fago UFV-AREG1 foi avaliada em solução de NaCl ($0,2 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$) para garantir equilíbrio osmótico. O pH da solução foi ajustado com HCl ($1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) para pHs finais de 1,9; 2,5; 2,9; 3,4; 4,8; 6,0; 6,7; 6,8 e 7. A suspensão contendo os bacteriófagos UFV-AREG1 em tampão SM foi adicionada na solução de NaCl pré-aquecida ajustada a ($37 \text{ }^\circ\text{C}$). A concentração final de bacteriófagos foi de aproximadamente $10^9 \text{ UFP}\cdot\text{mL}^{-1}$. Determinou-se a viabilidade dos bacteriófagos por meio de uma contagem do número de halos ou placas fágicas em cultura de *E. coli* O157:H7 em ágar BHI.

Viabilidade de bacteriófagos em soluções sanitizantes: Esta avaliação foi realizada segundo a metodologia adaptada de Olofsson et al. (1998) e Adams (1959). Volumes de 9 mL de soluções de dicloroisocianurato de sódio ($200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), ácido peracético ($80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e peróxido de hidrogênio ($60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) foram adicionados a 1 mL de suspensão de bacteriófagos para uma concentração final de $10^9 \text{ UFP}\cdot\text{mL}^{-1}$. Após 15 minutos de contato com a solução sanitizante, determinou-se o número de bacteriófagos viáveis por meio de uma contagem do número de halos ou placas fágicas em cultura de *E. coli* O157:H7 em ágar BHI. Nenhum neutralizante foi adicionado às soluções testes, seguindo a metodologia descrita por Beuchat et al. (1998).

Análises estatísticas: Todos os experimentos anteriores foram conduzidos em um desenho inteiramente casualizado (DIC) com três repetições. O efeito dos parâmetros pH, temperatura, luz UV e luz fluorescente sobre a viabilidade dos bacteriófagos foi analisado por meio de ANOVA e por meio de comparação de médias, fazendo uso do teste *Tukey*, ambos ao nível de significância 5 %.

As médias de efeito das temperaturas sobre os bacteriófagos armazenados a 7 e $25 \text{ }^\circ\text{C}$ nos dias zero, um, dois, quatro, sete e catorze foram avaliadas pelo uso da regressão. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o *Minitab18*® *Statistical Software*.

One-step growth: O experimento de *One-step growth* foi realizado com base no método modificado de Lu e Breidt (2015). A cultura de *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895) foi ativada em caldo BHI até atingir fase exponencial de crescimento e centrifugada (10,000 x g por 5 minutos). Preparou-se uma suspensão em solução salina com turbidez equivalente a 0,5 na escala de Mcfarland (10^8 UFC·mL⁻¹). Esta suspensão bacteriana foi diluída até 10^7 UFC·mL⁻¹ e retirou-se 0,1 mL para um eppendorf contendo 0,8 mL de caldo BHI pré-aquecido a 37 °C. Uma suspensão do fago foi preparada em tampão SM (10^5 UFP·mL⁻¹) e 0,1 mL adicionado ao eppendorf com a cultura bacteriana (MOI: 0,01), seguindo com incubação a 37 °C por 10 minutos a 100 rpm. Após a incubação a suspensão foi centrifugada a 13,000 x g por 30 segundos e, o sobrenadante foi removido para determinar o título de bacteriófagos não adsorvidos.

O precipitado com bactérias e bacteriófagos absorvidos foi ressuspenso imediatamente em 20 mL de caldo BHI pré-aquecido a 37 °C. Uma amostra da ressuspenso de 1 mL foi filtrada (0,22 µm) e coletada a cada 5 minutos por um período de 60 minutos. Cada amostra foi diluída em tampão SM e o título determinado pelo método por meio de uma contagem do número de halos ou placas de lise em *E. coli* O157:H7 semeada em ágar BHI. O período latente foi definido como o intervalo de tempo entre o final da adsorção e o começo da primeira “explosão”, como indicado pelo início do período de aumento do título dos bacteriófagos. O *Burst size* foi calculado dividindo o número final de bacteriófagos liberados pelo número de bactérias infectadas. O número de bactérias infectadas foi estimado através da diferença entre número inicial de bacteriófagos e bacteriófagos não adsorvidos (LU E BREIDT, 2015; NIU et al., 2014).

Modulação na expressão proteica de *E. coli* O157:H7 pelo bacteriófago UFV-AREG1

Para avaliar o efeito da infecção do bacteriófago UFV-AREG1 sobre a expressão proteica por *E. coli* O157:H7, seguiu-se a metodologia modificada de Pieper et al., (2011). Duas suspensões contendo *E. coli* O157:H7 em BHI foi

incubada a 37 °C a 100 rpm por 48 horas até atingir densidade óptica $\geq 2,0$. Em um dos frascos foram adicionados 50 mL do bacteriófago UFV-AREG1 e ambos incubados por 18 minutos. Após o tempo de contato ambas as amostras foram centrifugadas por 12 minutos a 10.500 x g na temperatura de 4 °C, e os precipitados foram ressuspensos em 1 mL de água *MilliQ*.

As amostras foram adicionadas de lisozima 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e incubadas a 20 °C por 1 hora. Após este tempo as células foram lisadas por sonicação em banho de gelo em 5 ciclos de 30 segundos a 40.000 Hz, com intervalos de 60 segundos. Às amostras foram adicionadas RNase e DNase a 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, e 15 mM de MgCl_2 , agitadas a 150 rpm por 1 hora, a uma temperatura de 20 °C e centrifugadas a 16.000 x g por 1 hora a 4 °C. A fração solúvel e os corpos de inclusão resultantes foram coletados e rotulados, as frações proteicas insolúveis foram extraídas com tampão de extração (CHAPS 4% e DTT 40 mM), repetindo-se os ciclos de sonicação. As amostras foram estocadas a -20 °C para posterior quantificação proteica utilizando o método descrito por Bradford (Kruger, 1994), e a avaliação em gel monodimensional desnaturante de poliacrilamida a 12,5 % (m/v) (PIEPER et al., 2015). A eletroforese foi feita a 81 V; 12 mA; 1 W por 2 h 30 min. O gel foi fixado em solução contendo 40% v/v de etanol e 10% v/v de ácido acético e tingido com corante Blue Comassie 10% m/v por 3 dias.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O bacteriófago UFV-AREG1 foi isolado de água residuária de estábulo da Universidade Federal de Viçosa utilizando como micro-organismo hospedeiro *E. coli* ATCC 11229 (LOPEZ, 2013) e foi propagado em *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895) atingindo concentrações aproximadas de 10^{12} PFU·mL⁻¹.

A especificidade do bacteriófago UFV-AREG1 sobre diferentes espécies bacterianas foi avaliada por meio da visualização da formação de placas de lise sobre a superfície de ágar BHI. Os bacteriófagos apresentaram atividade lítica contra mais de uma estirpe de *E. coli*, mas não foram capazes de lisar outros gêneros, como *Pseudomonas*, *Salmonella* ou *Enterobacter*, além de *E. coli* O86:H35 (EPEC).

A similaridade entre estruturas da superfície de bactérias do mesmo gênero está relacionada com a especificidade de bacteriófagos sobre diferentes bactérias (KUTTER E SULAKVELIDZE, 2005). A especificidade de bacteriófagos por bactérias de um mesmo gênero pode tornar seu uso mais seguro e eficiente sobre o micro-organismo alvo (NIU et al., 2012).

O reconhecimento da bactéria pelo bacteriófago depende do tipo de bactéria a ser infectada. Por exemplo, em bactérias gram-positivas o reconhecimento bacteriófago-hospedeiro é realizado por estruturas presentes na parede celular da bactéria (peptideoglicano, ácido teicônico e lipoteicônico). Já em bactérias gram-negativas, a interação ocorre por meio do lipopolissacarídeo (LPS) e proteínas de membrana (KUTTER e SULAKVELIDZE, 2005).

A seletividade do bacteriófago UFV-AREG1 pelas diferentes estirpes testadas de *E. coli* torna-se uma grande vantagem na utilização de bacteriófagos em terapia e controle destes patógenos em alimentos, pois garante a exclusividade de ação sobre a estirpe *E. coli* O157:H7 e seus semelhantes. No entanto, a não especificidade no nível de gênero também pode representar uma limitação na utilização desse bacteriófago para o biocontrole e o desenvolvimento de métodos de identificação em alimentos.

Avaliação da estabilidade do bacteriófago UFV-AREG1

Os bacteriófagos perdem sua capacidade de infectar e lisar células bacterianas quando existem danos em seus elementos estruturais (cabeça, cauda e envelope), ou quando há perda de lipídios ou alterações estruturais no DNA (ACKERMANN et al., 2004). Fatores físico-químicos como temperatura, acidez, salinidade e íons podem estar correlacionados com tais danos, comprometendo a viabilidade dos bacteriófagos em diferentes ambientes (JONCZYK et al., 2011).

Temperaturas de refrigeração (7 °C) e ambiente (25 °C) são normalmente utilizadas para o transporte e armazenamento da maioria dos alimentos. Estas temperaturas representam um ambiente adequado para o desenvolvimento de *E.*

coli O157:H7 por contaminação direta ou cruzada, presentes em produtos cárnicos e lácteos, bem como em frutas e hortaliças. Essas temperaturas não afetaram de forma extrema o título do fago ao longo de 14 dias de armazenamento (Figura 1). A viabilidade semelhante dos fagos UFV- AREG1 nas duas temperaturas de armazenamento mostra que a estrutura (capsídeo e cauda) destes foi conservada (ACKERMANN et al., 2004).

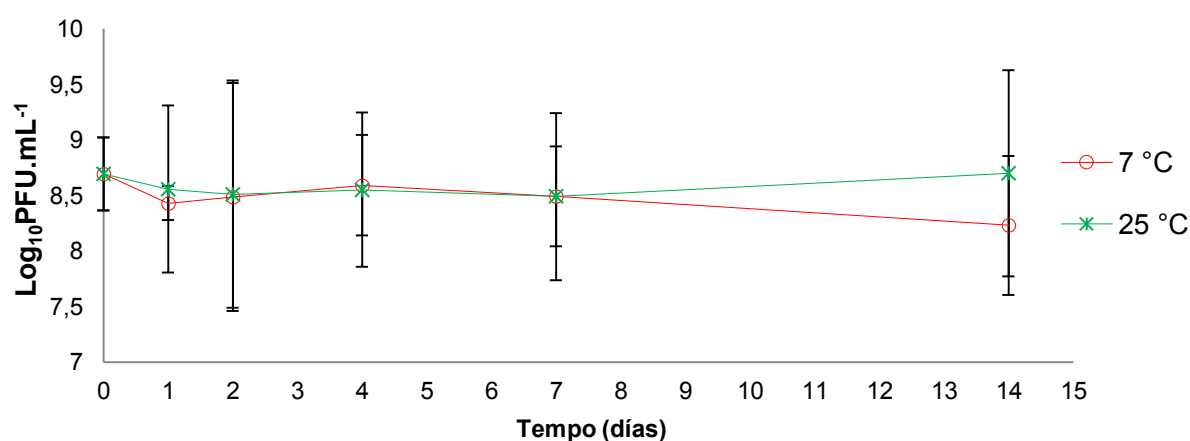


Figura 1: Efeito da temperatura sobre a viabilidade do fago UFV-AREG1. Estas temperaturas não afetaram de forma extrema o título do fago ao longo de 14 dias de armazenamento.

Alguns estudos que avaliam a perda da viabilidade dos bacteriófagos causada pela exposição a baixas temperaturas sugerem mudanças nas estruturas proteicas que conformam as caudas em bacteriófagos da ordem *Caudovirales*, inibindo sua capacidade de infectar o hospedeiro (THORNE e HOLT, 1974), o que gera a diminuição da concentração do fago no ambiente, e tem como consequência a perda da viabilidade do fago (COFFEY et al., 2011). O efeito do estresse térmico sobre os bacteriófagos é variável e difícil de prever, devido à diversidade de ambientes em que estes podem ser encontrados, o que pode estar relacionado com a temperatura ideal para o crescimento do hospedeiro.

O bacteriófago UFV-AREG1 apresentou sensibilidade à luz UV após 15 minutos de exposição, reduzindo as concentrações das partículas virais em até 1,20 ciclos logarítmicos (Tabela 2). A luz UV pode afetar o material genético das

partículas virais gerando danos nos ácidos nucleicos, tais como a formação de dímeros de pirimidinas (IKEHATA e ONO, 2011), afetando os processos de replicação dos ácidos nucleicos, o que impede a replicação dos vírus e afeta consideravelmente a sua viabilidade.

Tabela 2: Efeitos da luz UV e fluorescente sobre o fago UFV-AREG1.

Luz UV				
Tempo (min)	0	5	10	15
Título (PFU.mL ⁻¹)*	8.69 ± 0.33 ^a	7.73 ± 1.15 ^b	7.82 ± 0.15 ^b	7.49 ± 0.75 ^c
Luz fluorescente				
Tempo (dia)	0	7	14	
Título (PFU.mL ⁻¹)*	8.69 ± 0.33 ^a	8.48 ± 0.93 ^b	8.59 ± 0.15 ^b	

*Médias acompanhadas com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5 %

O bacteriófago UFV-AREG1 apresentou sensibilidade significativa à luz fluorescente, que são normalmente encontradas na maioria dos ambientes de produção de alimentos, mostrando reduções aproximadas de 0,10 ciclos logarítmicos após a exposição por duas semanas a este tipo de luz (Tabela 2). Apesar do resultado, este não inviabiliza a utilização do bacteriófago para diversas aplicações na indústria de alimentos que é amplamente iluminada, porém se faz necessária a ampliação do estudo com um tempo maior ou verificação da estabilidade com uma embalagem protetora de cor âmbar, para garantir a viabilidade deste por um período maior de tempo.

Considerando o interesse do uso do bacteriófago UFV-AREG1 no controle de patógenos em animais durante diferentes processos produtivos, os bacteriófagos UFV-AREG1 foram testados em relação à viabilidade em diferentes valores de pH. Os resultados mostraram que os bacteriófagos UFV-AREG1 são sensíveis a ambientes ácidos. Como pode ser observado na Figura 2, em valores de pH inferiores a 3,4 observou-se uma redução significativa do título a um nível não detectável após 5 minutos de contato com a solução com o pH ajustado. Para o mesmo tempo de contato em pH aproximado de 3,4 apresentou-se uma queda

significativa na concentração do fago UFV-AREG1 que foi de aproximadamente 4,5 ciclos log. ($5,39 \pm 1,38$ PFU.mL⁻¹). Com pH acima de 3,4, a maior perda na viabilidade foi de apenas 0.25 ciclos log., o que sugere que os bacteriófagos mantêm sua viabilidade sem afetar os processos de infecção e multiplicação das partículas virais.

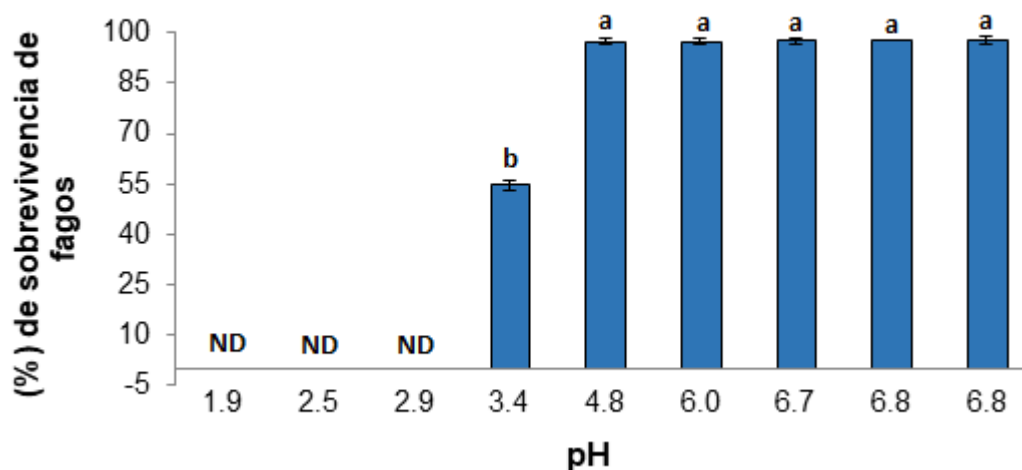


Figura 2: Efeito do pH na viabilidade do bacteriófago UFV-AREG1. No gráfico se evidencia a queda significativa na taxa de sobrevivência do fago UFV-AREG1 em pHs inferiores a 4,8. Médias acompanhadas com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5 %. ND: não detectável pela técnica.

A maioria dos bacteriófagos podem ser armazenados durante longos períodos de tempo em pH entre (6 e 8) em soluções tampão (JONCZYK et al. 2011). Contudo, o título dos bacteriófagos tende a diminuir com o abaixamento do pH (LY-CHATAIN, 2014; JONCZYK et al., 2011), devido a processos de agregação (LANGLET et al., 2007). Observou-se que a concentração de íons de hidrogênio no meio permite a agregação de bacteriófagos de tal modo que, em pH próximo ou abaixo do ponto isoelétrico das proteínas dos bacteriófagos ocorre neutralização das interações eletrostáticas (repulsão), predominando as interações atrativas (Van der Waals e

interações hidrofóbicas) que favorece o contato entre os bacteriófagos resultando em agregação.

A agregação de bacteriófagos é um fenômeno reversível, no entanto é interpretada como inativação na determinação da concentração. Os bacteriófagos são quantificados por contagem de unidades infecciosas (unidades formadoras de placas de lise ou PFU) (OLSON et al., 2004, DAWSON et al., 2005). Uma unidade pode ser constituída por uma partícula viral individual ou por um único agregado (contendo várias partículas virais). Logo, a agregação pode explicar a redução no título quando o $\text{pH} \leq \text{pI}$ das proteínas dos bacteriófagos visto que, o aumento no número de bacteriófagos agregados reduz o número de placas de lise formadas em comparação com o número de placas de lises que seriam formadas se os bacteriófagos estivessem individualizados.

Estes dados demonstram que a sensibilidade ao pH é um dos fatores mais importantes para a manutenção da viabilidade dos bacteriófagos, portanto, garantir a estabilidade dos bacteriófagos deve ser a principal consideração em relação as aplicações projetadas. O fago UFV-AREG1 tem sido encapsulado em diferentes matrizes com o intuito de utilizá-lo como agente de biocontrole de *E. coli* O157:H7 em alimentação animal. Para isso, os métodos de encapsulamentos devem empregar processos com condições suaves, materiais compatíveis com os bacteriófagos e que não comprometam sua atividade biológica (BATALHA, 2017; COFFEY et al., 2011).

Neste trabalho, observou-se a sensibilidade do fago de *Escherichia* UFV-AREG1 em algumas soluções sanitizantes utilizadas comumente na indústria de alimentos, durante a sanitização de 15 minutos. Segundo os resultados mostrados na Tabela 3, o fago UFV-AREG1 apresentou maior sensibilidade ao peróxido de hidrogênio, pois a maior redução no número de bacteriófagos é devida ao efeito deste sanitizante. Em relação ao ácido peracético, os bacteriófagos perderam a viabilidade quando submetidos nesta solução durante a sanitização por um período de 15 minutos. O ácido peracético é conhecido como um agente antimicrobiano mais eficiente do que o peróxido de hidrogênio, isto explica o fato dos bacteriófagos terem

perdido a capacidade de infecção após contato com ácido peracético, pois este atua oxidando os grupos sulfidrilas das enzimas e possui ação positiva contra vírus (ANDRADE et al., 2008).

Tabela 3: Logaritmo de UFP/mL de bacteriófagos UFV-AREG1 submetidos a tratamento em diferentes soluções sanitizantes utilizadas na indústria de alimentos, após 15 minutos.

Fago	Controle Log. UFP/mL	Dicloroisocianurato de sódio (219 ± 13,2 mg/L) Log. UFP/mL	Ácido peracético (91 ± 17,2 mg/L) Log. UFP/mL	Peróxido de hidrogênio (58,1 ± 5,2 mg/L) Log. UFP/MI
UFV-AREG1	11,1 ± 0,1	10,0 ± 0,4	< 1 ± 0,0	9,8 ± 0,1

O bacteriófago UFV-AREG1 tem sido utilizado como agente biosanitizante previamente por Lopez (2013), comparando o efeito redutor na população de *E. coli* O157:H7 do mesmo e destes sanitizantes no processo de sanitização de tomates cereja. Neste trabalho o bacteriófago UFV-AREG1 mostrou a mesma eficiência na redução da população de *E. coli* O157:H7 que o ácido per-acético, o dicloroisocianurato de sódio e o peróxido de hidrogênio, o que sugere a possibilidade de uso como biosanitizante. De acordo com os resultados de viabilidade do fago UFV-AREG1, após os processos de sanitização é possível utilizá-lo para complementar os processos de sanitização convencionais com estes produtos, reforçar ou complementá-los, para evitar problemas de recontaminação de produtos minimamente processados, tal como o tomate cereja.

A viabilidade do bacteriófago UFV-AREG1 depende da sua capacidade de reconhecimento dos receptores celulares encontrados na superfície da bactéria e da integridade da estrutura viral do fago propriamente dito. O genoma viral encontra-se empacotado em um capsídeo proteico ou glicoproteínas, algumas destas estruturas podem ser afetadas por fatores ambientais como temperatura, pH baixos, entre outros. A desnaturação de proteínas ou glicoproteínas presentes no capsídeo poderia explicar a incapacidade de replicação viral e perda da viabilidade dos

bacteriófagos após a exposição destes às condições de estresse como temperatura e outras descritas acima (GELDERBLUM, 1996).

Parâmetros cinéticos

Os parâmetros de multiplicação do fago UFV-AREG1 foram calculados a partir da curva de *One-step growth* (figura 3). A curva de crescimento do fago mostrou um período latente aproximado entre 20 e 25 minutos, o que está muito próximo da faixa de período latente típico muito variável (21 a 120 minutos) observada para a maioria dos bacteriófagos da família *Myoviridae* (LU e BREIDT, 2015). O período de latência é o prazo que regula o tempo de geração dos bacteriófagos e o *burst size* (ABEDON et al., 2001).

A figura 3 mostra a dinâmica de replicação do bacteriófago UFV-AREG1 quando infecta *E. coli* O157:H7. Os bacteriófagos seguem um crescimento exponencial e após aproximadamente 50 minutos em contato com a bactéria alvo, são liberados por volta de 18 bacteriófagos por bactéria infectada. O rápido processo de replicação do bacteriófago UFV-AREG1 pode representar uma vantagem para a aplicação deste bacteriófago como método de biocontrole sobre *E. coli* O157:H7, pois cada ciclo de infecção, replicação, montagem e liberação das novas partículas virais é realizado em aproximadamente 60 minutos.

O *burst size* médio foi de aproximadamente 18 partículas virais por célula infectada, o qual foi inferior ao *burst size* de 50 a 100 UFP/célula encontrado para muitos bacteriófagos da família *Myoviridae* (PARK et al, 2012; BAO et al., 2011). Esta variação pode estar relacionada ao tamanho do genoma do bacteriófago e ao tempo necessário para que os processos de replicação, montagem viral, e liberação de novas partículas virais sejam realizados com sucesso. Segundo Abedon e colaboradores (2001) grandes *burst size* estão relacionados a grandes períodos de latência e vice-versa.

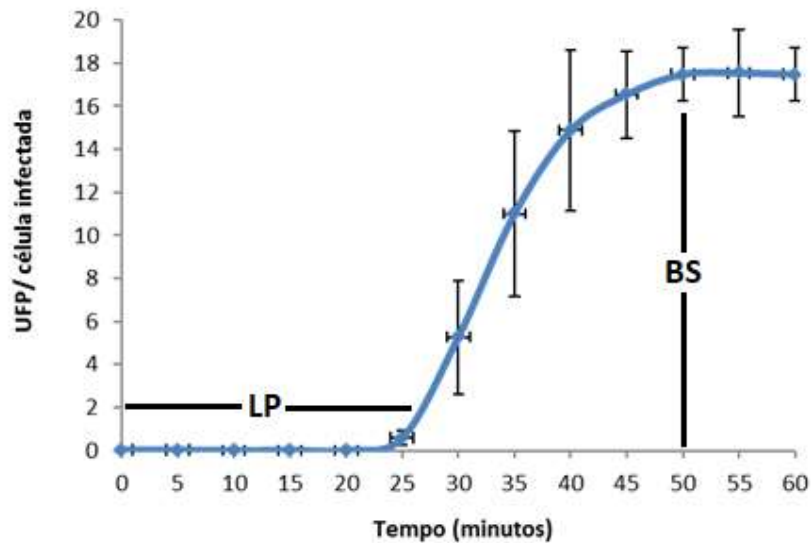


Figura 3: Parâmetros cinéticos do bacteriófago UFV-AREG1. O período de latência do bacteriófago foi de aproximadamente 25 minutos. O ciclo lítico do bacteriófago UFV-AREG1 foi de aproximadamente 50 minutos. LP: período de latência, BS: Burst size.

Os parâmetros cinéticos dos bacteriófagos possuem influência na fisiologia do hospedeiro (ABEDON et al., 2001), por esta razão, os ciclos virais devem acontecer em tempos curtos quando comparados com o tempo de geração do hospedeiro, com a finalidade de garantir a eficiência na redução da população microbiana. A eficiência no biocontrole é a razão mais importante para conhecer os parâmetros de crescimento dos bacteriófagos com potencial de uso no biocontrole de patógenos.

Modulação na expressão proteica de *E. coli* O157:H7 pelo bacteriófago UFV-AREG1

A figura 4 sugere algumas diferenças na expressão proteica entre *E. coli* O157:H7 em condições normais e a mesma quando se encontra em contato com o bacteriófago UFV-AREG1 por um tempo aproximado de 18 minutos. Neste ponto, e de acordo com os parâmetros cinéticos (Figura 3), é muito provável que o bacteriófago UFV-AREG1 tenha começado o processo de infecção após a adesão à superfície bacteriana. De acordo com os resultados, o gel sugere que existe diferença na expressão proteica de *E. coli* O157:H7 quando a bactéria é infectada

pelo bacteriófago UFV-AREG1. No gel pode-se observar que algumas bandas desaparecem ou a intensidade destas diminui. Isto pode sugerir que algumas proteínas podem estar sendo expressas em menor quantidade que outras devido à infecção fágica, ou como indica o processo de replicação lítica, a maquinaria celular da bactéria é voltada para a produção de novas partículas virais do fago UFV-AREG1.

As diferenças na expressão da *E. coli* O157:H7 infectada pelo bacteriófago UFV-AREG1 sugere que novas proteínas comecem a ser sintetizadas após a infecção e todos os recursos bacterianos são direcionados para a geração e montagem de novas partículas virais.

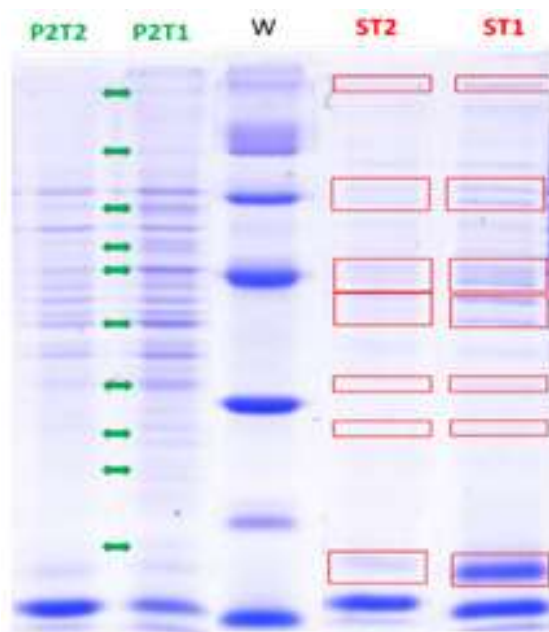


Figura 4: SDS – PAGE electrophoresis. **Cluster de tratamentos:** **S:** Proteínas no sobrenadante; **P1:** proteínas no primeiro pellet; **P2:** proteínas no segundo pellet. **T1:** *E. coli* O157:H7 em condições normais; **T2:** *E. coli* O157:H7 infectada pelo fago UFV-AREG1; **W:** marcador de peso.

A imagem sugere que existem diferenças metabólicas em *E. coli* O157:H7 durante a infecção, por isso se faz necessário o trabalho na identificação destas modificações durante o ciclo viral do fago, para determinar as mudanças mais importantes sofridas pela bactéria que permitam conhecer melhor o processo de

infecção e inativação bacteriana, que possa ser aplicado como ferramenta para o controle e identificação *E. coli* O157:H7 em diferentes áreas, tais como a produção de novas substâncias antimicrobianas.

Porém neste estudo não foi possível identificar e caracterizar as proteínas que foram diferencialmente expressas no gel, devido a problemas de sensibilidade e padronização de equipamentos e procedimentos. Fazendo-se necessária a validação do proteoma do fago e a caracterização do que é diferencialmente expresso nos processos de infecção deste fago em *E. coli* O157:H7.

CONCLUSÕES

Embora o fago UFV-AREG1 não tenha apresentado atividade contra outras estirpes de interesse alimentar tais como *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, e até mesmo *Escherichia* do tipo enteropatogênica, as altas concentrações obtidas para este fago e sua especificidade contra a estirpe *E. coli* O157:H7 reforçam seu potencial para aplicação para controlar este patógeno em eventuais processos de contaminação, durante ou pós processamento, devido à estabilidade que o fago apresentou na maioria dos parâmetros testados e aos parâmetros cinéticos calculados, que indicam que 18 novas partículas virais são geradas por cada célula infectada, em ciclos de aproximadamente 60 minutos, apresentando um tempo curto de replicação que pode ser facilmente aproveitado na indústria de alimentos.

O fago UFV-AREG1 ficou estável na presença de luz fluorescente ao longo de duas semanas de exposição e em temperaturas de refrigeração e soluções com pH entre 3,4 e 7, indicando ampla estabilidade e potencial de uso nas condições da indústria de alimentos. Apesar de o ácido peracético afetar a capacidade de infecção de fago UFV-AREG1, concentrações de peróxido de hidrogênio e o dicloroisocianurato de sódio normalmente utilizadas na indústria de alimentos não causaram sua inviabilização, apresentando grande potencial de uso em sinergia com estes sanitizantes.

O fago UFV-AREG1 pode ser utilizado como um agente alternativo para o controle de *E. coli* O157:H7, desde que consideradas as condições em que ele se comporta de forma estável. A viabilidade dos bacteriófagos nas soluções sanitizantes ratifica a possibilidade de combinação destas tecnologias para controle desse patógeno. As proteínas que são diferencialmente expressas pela infecção fágica em *E. coli* O157:H7 podem determinar diretrizes para a identificação de moléculas ou até mecanismos que possam ser explorados no controle ou identificação deste importante patógeno de interesse alimentar, fazendo-se necessário orientar as pesquisas neste âmbito.

REFERÊNCIAS

ABEDON, S. T., HERSCHLER, T. D., & STOPAR, D. Bacteriophage latent-period evolution as a response to resource availability. **Applied and Environmental Microbiology**, 67(9), 4233-4241, 2001.

ACKERMANN, H. W., TREMBLAY, D., & MOINEAU, S. Long-term bacteriophage preservation. **WFCC Newsletter**, 38, 35-40, 2004.

ANDRADE, N.J. ; PINTO, C.L.O.; ROSADO, M.S. CONTROLE DE HIGIENIZAÇÃO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS. IN: ANDRADE, N.J. (Ed). Higiene na Indústria de Alimentos: Avaliação e Controle de Adesão e Formação de Biofilmes Bacterianos. São Paulo: **Varela**, p. 181-225. 2008.

BAO, H., ZHANG, H., & WANG, R. Isolation and characterization of bacteriophages of *Salmonella* enteric serovar Pullorum. **Poultry science**, 90(10), 2370-2377, 2011.

BATALHA, L. S. (2017). Encapsulamento de bacteriófagos em diferentes matrizes e avaliação do potencial para a fagoterapia. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). **Universidade Federal de Viçosa**, Brasil. 2017.

COFFEY, B., RIVAS, L., DUFFY, G., COFFEY, A., ROSS, R. P., & MCAULIFFE, O. Assessment of *Escherichia coli* O157: H7-specific bacteriophages e11/2 and e4/1c in model broth and hide environments. **International journal of food microbiology**, 147(3), 188-194, 2011.

GELDERBLUM, H. R. Structure and classification of viruses, 1996.

GYLES, C. L. Shiga toxin-producing: An overview. **Journal of animal science**, 85 (13_suppl), E45-E62, 2007.

IKEHATA, H., & ONO, T. The mechanisms of UV mutagenesis. **Journal of radiation research**, 52(2), 115-125, 2011.

JOŃCZYK, E., KŁAK, M., MIĘDZYBRODZKI, R., & GÓRSKI, A. The influence of external factors on bacteriophages—review. **Folia microbiologica**, 56(3), 191-200, 2011.

KUTTER, E. E. & SULAKVELIDZE, A. Bacteriophages: Biology and applications. **CRC Press**, Boca Raton, FL. 2005.

LANGLET, J., GABORIAUD, F., & GANTZER, C. Effects of pH on plaque forming unit counts and aggregation of MS2 bacteriophage. **Journal of applied microbiology**, 103(5), 1632-1638, 2007.

LEE, H., KU, H. J., LEE, D. H., KIM, Y. T., SHIN, H., RYU, S., & LEE, J. H. Characterization and Genomic Study of the Novel Bacteriophage HY01 Infecting Both *Escherichia coli* O157: H7 and *Shigella flexneri*: Potential as a Biocontrol Agent in Food. **PloS one**, v. 11, n. 12, e0168985, 2016.

LOPEZ, M. E. S. Bacteriófagos para Biocontrole De *Escherichia coli* enterohemorrágica. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). **Universidade Federal de Viçosa**, Brasil. 2013.

LOPEZ, M. E. S., BATALHA, L. S., VIDIGAL, P. M. P., ALBINO, L. A. A., BOGGIONE, D. M. G., GONTIJO, M. T. P., BAZZOLLI, D. M. S., MENDONCA, R. C. S. Genome sequence of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* bacteriophage UFV-AREG1. **Genome announcements**, 4(5), e00412-16, 2016.

LU, ZHONGJING and BREIDT, FRED. *Escherichia coli* O157: H7 bacteriophage Φ 241 isolated from an industrial cucumber fermentation at high acidity and salinity. **Frontiers in microbiology**, v. 6, 2015.

LY-CHATAIN, M. H. The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy, 2014.

NIU, Y. D., MCALLISTER, T. A., NASH, J. H., KROPINSKI, A. M., & STANFORD, K. Four *Escherichia coli* O157: H7 phages: a new bacteriophage genus and taxonomic classification of T1-like phages. **PLoS One**, 9(6), e100426, 2014

OLSON, M. R., AXLER, R. P., & HICKS, R. E. Effects of freezing and storage temperature on MS2 viability. **Journal of virological methods**, 122 (2), 147-152, 2004.

PIEPER, R., ZHANG, Q., CLARK, D.J., HUANG, S-T., SUH, M-J., BRAISTED, J. C., PAYNE, S. H., FLEISCHMANN, R. D., PETERSON, S. N., TZIPORI, S. Characterizing the *Escherichia coli* O157:H7 proteome including protein associations with higher order assemblies. **PLoS ONE** 6(11), 2011.

PARK, M., LEE, J. H., SHIN, H., KIM, M., CHOI, J., KANG, D. H. Characterization and comparative genomic analysis of a novel bacteriophage, SFP10, simultaneously inhibiting both *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7. **Appl. Environ. Microbiol.** V. 78, p. 58-69, 2012.

THORNE, C. B., & HOLT, S. C. Cold lability of *Bacillus cereus* bacteriophage CP-51. **Journal of virology**, 14(4), 1008-1012, 1974.

6. Conclusões gerais

O fago UFV-AREG1 foi devidamente sequenciado e caracterizado revelando variada estabilidade e parâmetros cinéticos que favorecem seu uso como potencial agente de biocontrole de *E. coli* O157:H7,

As partículas virais do fago UFV-AREG1 foram classificadas na Família *Myoviridae* e Ordem *Caudovirales*, de acordo com suas características morfológicas e genômicas.

As análises bioinformáticas permitiram classificar o fago UFV-AREG1 como um novo membro do gênero *T4virus*, apresentando identidade com outros bacteriófagos do mesmo gênero, tais como HY01, RB33 e RB32.

O fago UFV-AREG1 possui dois clusters funcionais identificados. O cluster correspondente aos processos de replicação do genoma e metabolismo, e o de eventos de lise celular. O fago UFV-AREG1 codifica 113 proteínas que ainda não possuem função conhecida.

De acordo com os resultados obtidos nesta e outras pesquisas desenvolvidas com o bacteriófago UFV-AREG1, este apresentou grande potencial de uso na indústria de alimentos, porém recomenda-se aprofundar nas pesquisas para obter produtos com diferentes aplicações para indústria de alimentos, baseados nas características e propriedades exclusivamente líticas do fago UFV-AREG1.