

MONIQUE RENON ELLER

**CARACTERIZAÇÃO DE BACTERÍOFAGOS LÍTICOS  
ISOLADOS DE SORO DE QUEIJOS**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola, para  
obtenção do título *Magister  
Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2010

MONIQUE RENON ELLER

**CARACTERIZAÇÃO DE BACTERÍOFAGOS LÍTICOS  
ISOLADOS DE SORO DE QUEIJOS**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola, para  
obtenção do título *Magister  
Scientiae*.

APROVADA: 16 de Julho de 2010.

---

Prof. Leandro Licursi de Oliveira  
(Coorientador)

---

Prof.<sup>a</sup> Célia Alencar de Moraes  
(Coorientadora)

---

Prof. Marcos Rogério Tótola

---

Prof.<sup>a</sup> Elza Fernandes de Araújo

---

Prof. Sérgio Oliveira de Paula  
(Orientador)

*Dedico esta vitória a meus pais e irmãos. Meu porto-seguro, pra onde sempre poderei voltar e com quem sempre poderei contar.*

“Dizem que sou um homem de sorte... só sei que quanto mais me esforço, mais sorte tenho” (Anthony Robbins).

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer:

A Deus, pela saúde e providência nas horas necessárias.

À Universidade Federal de Viçosa e aos professores, funcionários e amigos dos Departamentos de Microbiologia e de Biologia Geral, pela oportunidade, espaço físico, estrutura organizacional, suporte material, apoio e ensinamentos. Um agradecimento especial à Nilcéia, pela paciência e ajuda.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro a esta pesquisa.

Ao meu orientador, professor Sérgio Oliveira de Paula, pelo aconselhamento e estímulo e ao professor Leandro Licursi de Oliveira, pelas boas idéias, disponibilidade e presença constante durante meus experimentos.

Aos meus coorientadores, pela dedicação, aconselhamentos e disponibilidade.

Aos alunos do Laboratório de Imunovirologia Molecular e Glicoimunologia e aos técnicos, João e Jorge, pela amizade, ensinamentos e disponibilidade. Em especial ao grupo dos fagos: Roberto, Lucas, Tácio, Pâmela, Victor e Ângelo, pela luta diária e aprendizados.

Ao Coral da UFV, pelo lazer e amizade.

A toda a minha família, pelo orgulho e pelos conceitos de vida. Em especial, aos meus pais, Romeu e Valéria, pela fé e pela força incondicionais; às minhas irmãs, Pâmela e Allana, pela amizade e cumplicidade, e ao meu irmão Luan pelas lições de vida e pela nova vida que nos trouxe; ao meu noivo, Rafael, pelo ânimo e força nos momentos em que nada parecia dar certo.

Enfim, a todos os que estiveram ao meu lado e que contribuíram direta ou indiretamente para esta realização, meu muito obrigado!

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>vii</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>x</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>8</b>
3.1 AMOSTRAGEM .....	8
3.2 ISOLAMENTO DE BACTERÍOFAGOS.....	9
3.3 ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E IDENTIFICAÇÃO .....	11
3.3.1 Extração do genoma viral.....	11
3.3.2 Eletroforese em Gel em Campo Pulsado .....	12
3.3.3 Análises com Enzimas de Restrição .....	12
3.3.4 Amplificação (Multiplex PCR).....	13
3.3.5 Sequenciamento e Análise de Distanciamento Genético.....	14
3.3.6 Determinação do perfil de proteínas .....	15
3.3.7 Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Transmissão .....	16
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>17</b>
4.1 ISOLAMENTO DE BACTERÍOFAGOS.....	17
4.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E IDENTIFICAÇÃO .....	19
4.2.1 Genoma viral .....	19
4.2.2 Análise de Restrição .....	21
4.2.3 Amplificação por Multiplex PCR.....	23
4.2.4 Sequenciamento .....	25
4.2.5 Perfil de proteínas .....	28
4.2.6 Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Transmissão .....	30
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>32</b>
<b>6 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>33</b>
<b>7 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>34</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Placas de lise obtidas a partir do soro 03 coletado no Laticínio A .....	18
<b>Figura 2</b> – Genoma viral extraído a partir dos bacteriófagos isolados e submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8%. .....	20
<b>Figura 3</b> – Eletroforese em campo pulsado para estimativa do tamanho do genoma dos isolados LIMG1 e LIMG4. ....	21
<b>Figura 4</b> – Perfil de clivagem enzimática do bacteriófago LIMG1 pelas enzimas <i>EcoR</i> I e <i>Hae</i> III e do bacteriófago LIMG3 pela enzima <i>EcoR</i> I. ....	22
<b>Figura 5</b> – Multiplex PCR para identificação dos bacteriófagos isolados. ....	24
<b>Figura 6</b> – Confirmação da transformação de bactérias DH5α com a sequência de DNA viral amplificada. ....	25
<b>Figura 7</b> – Alinhamento de sequências entre o isolado LIMG1 e outros fagos do grupo 936. ....	27
<b>Figura 8</b> – Distância evolutiva resultante do alinhamento das sequências do isolado LIMG1 e de outros fagos de <i>Lactococcus</i> já descritos.....	27
<b>Figura 9</b> – Perfil proteico dos bacteriófagos isolados.....	29
<b>Figura 10</b> – Perfil proteico do isolado LIMG1. ....	29
<b>Figura 11</b> – Micrografias Eletrônicas de Transmissão do bacteriófago LIMG1.....	31
<b>Figura 12</b> – Micrografias Eletrônicas de formas virais encontradas na amostra 03.....	31

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Amostras de soro de queijo coletadas em laticínios da Zona da Mata Mineira.....	9
<b>Tabela 2</b> – <i>Primers</i> utilizados para classificação dos bacteriófagos isolados .....	13
<b>Tabela 3</b> – Número de placas de lise isoladas a partir das amostras coletadas e seus hospedeiros.....	19
<b>Tabela 4</b> – Isolados cujas sequências foram alinhadas com o fragmento obtido para o fago LIMG1 .....	26
<b>Tabela 5</b> – Grupos virais baseados no padrão de perfil de proteínas .....	30

## RESUMO

ELLER, Monique Renon, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2010. **Caracterização de bacteriófagos líticos isolados de soro de queijos**. Orientador: Sérgio Oliveira de Paula. Coorientadores: Leandro Licursi de Oliveira, Hilário Cuquetto Mantovani e Célia Alencar de Moraes.

Bactérias do Ácido Lático (BAL) podem ser infectadas e lisadas por uma extensa faixa de bacteriófagos, o que constitui reconhecidamente a principal causa de fermentação falha ou lenta na indústria de laticínios moderna. Processos fermentativos contaminados prejudicam a qualidade do produto ou causam até mesmo sua perda completa. Embora avanços tecnológicos tenham reduzido a incidência destas infecções, eles certamente não as eliminaram. Assim, o objetivo deste trabalho foi o isolamento, identificação e caracterização molecular de bacteriófagos líticos de *Lactococcus lactis* a partir de soros provenientes de fermentações lácticas. Para isto, amostras de soro foram coletadas em três diferentes laticínios e, a partir deles, foram isolados 17 bacteriófagos, os quais foram propagados em *L. lactis* cultivado em meio GM17 e caracterizados molecularmente utilizando-se as técnicas de multiplex PCR, perfil de restrição enzimática de DNA, perfil proteico, microscopia eletrônica de transmissão, clonagem e sequenciamento. A extração do genoma dos bacteriófagos isolados e sua análise revelaram uma fita de DNA de 48 kb para o isolado LIMG1 e 42 kb para o isolado LIMG4, enquanto o perfil de proteínas dos fagos permitiu a distinção de quatro grupos, sendo que a diferenciação entre eles foi condizente com a amostra da qual foram isolados. A técnica de PCR,

associada à análise microscópica, confirmou a presença de fagos do grupo 936, família *Siphoviridae*, o mais abundante em laticínios em todo o mundo. Foram encontrados fagos de cabeça isométrica de 50 nm de diâmetro e caudas longas de cerca de 180 nm de comprimento, sem placa basal. O sequenciamento do genoma do isolado LIMG1 revelou alta identidade com outros representantes do grupo 936, embora tenham sido encontradas duas mutações pontuais que o diferenciaram dos demais.

## ABSTRACT

ELLER, Monique Renon, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2010.  
**Characterization of Lytic Bacteriophages Isolated from Cheese Whey.**  
Adviser: Sérgio Oliveira de Paula. Co-Advisers: Leandro Licursi de Oliveira,  
Hilário Cuquetto Mantovani and Célia Alencar de Moraes

Lactic acid bacteria (LAB) can be infected and lysed by an extensive range of bacteriophages, which is recognized as the main cause of failure or slow fermentation in the modern dairy industry. Contaminated fermentation processes affect product quality or even cause its complete loss. Although technological advances have reduced the incidence of these infections, they certainly do not eliminated it. The objective of this work was the isolation, identification and molecular characterization of lytic bacteriophages of *Lactococcus lactis* from sera from lactic fermentation. For this, serum samples were collected from three different dairies facilities. From one of them, were isolated 17 bacteriophages, which were propagated in *L. lactis* grown in GM17 medium and molecularly characterized using the techniques of multiplex PCR, DNA restriction profile, protein profile, transmission electron microscopy, cloning and sequencing. The extraction of the genome of bacteriophages isolated and its analysis revealed a strand of DNA of 48 kb for phage LIMG1 and 42 kb for phage LIMG4, while phage protein profile allowed the distinction of four groups, and the differentiation between them was consistent with the sample from which they were isolated. The PCR,

coupled to microscopic analysis, confirmed the presence of members of the group 936-type phages, *Siphoviridae* family, the most abundant in dairy products worldwide. Phages contain isometric heads with 50 nm in diameter and a 180 nm long tail, without basal plate. The amplified sequence of isolate LIMG1 revealed high identity with other members of 936-type phages, although two punctual mutations had differed LIMG1 from the others.

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores de leite e derivados no mundo, sendo que o estado de Minas Gerais responde por cerca de 26% de toda a produção nacional, sendo o primeiro Estado em aquisição de leite. Deste total, 21% são utilizados como matéria-prima para a fabricação de queijos.

Na indústria láctica, a maior parte dos fermentos utilizados na produção de queijos é composta por diferentes cepas da bactéria *Lactococcus lactis*. Porém, entre 1 e 10% destas fermentações é lenta ou até mesmo falha para a produção de ácido láctico para a obtenção do pH desejado. O principal motivo destas falhas são infecções das bactérias fermentativas por bacteriófagos líticos específicos, o que contribui para a diminuição da qualidade do produto final ou provoca até mesmo seu descarte. Dados sugerem que, no Brasil, falhas fermentativas podem ocorrer em intervalos de apenas dois meses em um mesmo laticínio, de acordo com suas condições e instalações.

Assim, o estudo destas infecções e de seus agentes é de grande importância para a indústria láctica em todo o mundo, pois permite sua prevenção e controle. Mesmo assim, no Brasil há apenas um registro isolamento e caracterização destes agentes, o que gera um grande atraso no desenvolvimento de novas tecnologias que possam diminuir os prejuízos causados por estes vírus todos os anos.

Portanto, o objetivo do nosso trabalho foi isolar e caracterizar bacteriófagos líticos de *L. lactis* a partir de soros provenientes de processos

fermentativos em laticínios da Zona da Mata Mineira, a fim de prover informações que possam auxiliar novas pesquisas para o desenvolvimento de novos fermentos e implementação de planos de ação contra estas infecções.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Bacteriófago, ou fago, é um termo geral que engloba todos os vírus que infectam hospedeiros pertencentes aos domínios *Archaea* e *Bacteria* (Ackermann, 2003). Os fagos foram descobertos independentemente por Frederick William Twort em 1915 e posteriormente por Felix D'Hérelle em 1917. A natureza viral dos bacteriófagos foi confirmada em 1940 com o advento do microscópio eletrônico (Duckworth, 1976).

Bacteriófagos de Bactérias Lácticas são formados por proteínas que compõem o capsídeo (ou cabeça) e uma cauda composta por uma bainha separada ou não do capsídeo por um colar. Dentro dela há um tubo chamado núcleo da cauda, e em sua porção terminal se encontra a placa basal, a qual contém fibras e pinos. No interior do capsídeo encontra-se o material genético, que pode ser composto por uma fita simples ou dupla de DNA ou RNA com a presença, algumas vezes, de enzimas (Hassam & Frank, 2001).

Os bacteriófagos que infectam bactérias do ácido láctico geralmente consistem de uma cabeça isométrica ou alongada, e uma secção de cauda. Sua classificação se baseia em características morfológicas, sorologia e homologia DNA-DNA. Seis tipos morfológicos de fagos lácticos são comumente encontrados. Esses incluem isométricos pequenos, isométricos pequenos com colar, isométricos pequenos com

cauda curta, isométricos pequenos com cauda longa e isométricos grandes e alongados (Lodics & Steenson, 1993). Assim, fagos de bactérias lácticas são divididos em três famílias distintas, de acordo com seus morfotipos: *Myoviridae* (cauda contrátil), *Siphoviridae* (cauda longa não-contrátil), e *Podoviridae* (cauda curta não-contrátil), segundo a classificação de Bradley, 1967, e representam 25%, 61% e 14%, respectivamente, dos fagos caudados (ordem *Caudovirales*).

Os bacteriófagos de bactérias do ácido láctico mais bem caracterizados são os morfotipos B1 e B2 (*Siphoviridae*) e C3 (*Podoviridae*), que são fagos de *Lactococcus* sp. e *Lactobacillus plantarum*. Atualmente, dentre os bacteriófagos de bactérias lácticas isolados, 26 de *Lactococcus*, 15 de *Lactobacillus*, um de *Leuconostoc* e 21 de *Streptococcus* já tiveram suas sequências genômicas determinadas, de acordo com o banco de genomas do Entrez Genome, do National Center for Biotechnology Information

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/genlist.cgi?taxid=10239&type=6&name=Phages>, 18/08/2010).

Os fagos de *L. lactis* pertencem, em sua maioria, à família *Siphoviridae* e podem ser subdivididos em três grupos principais, de acordo com suas características estruturais e moleculares. Os membros do grupo de fagos do tipo 936 são virulentos e possuem uma cabeça isométrica pequena, e correspondem a aproximadamente metade de todos os bacteriófagos de *L. lactis* já isolados. O grupo de fagos virulentos do tipo c2 possui cabeça alongada, enquanto o grupo do tipo P335 possui fagos virulentos e temperados, com cabeça isométrica pequena e placa basal (Brussow, 2001). Fagos de *L. lactis* com características distintas têm sido isolados em menores proporções, sendo alguns deles membros da família *Podoviridae*.

Infecções por bacteriófagos são causadas tanto por fagos líticos como por fagos temperados. Infecções por fagos líticos resultam na liberação das partículas virais infecciosas (virions) no ambiente (Hassan & Frank, 2001). Inicialmente, ocorre a adsorção do virion na superfície da

célula bacteriana mediada pela placa basal, espículas, ou fibras (Moineau, 2005). Essas estruturas virais reconhecem glicoproteínas de superfície, as quais agem como sítios específicos de ligação. Após a adsorção, o fago injeta seu material genético dentro do hospedeiro, o qual tem seu metabolismo normal desviado para a produção de material genético e proteínas virais. Este processo termina com a montagem dos virions dentro da célula hospedeira. Finalmente, o ciclo lítico é completado quando enzimas são produzidas e degradam o peptidoglicano da parede celular bacteriana, levando à formação de poros na mesma. Os eventos que se seguem levam a um desequilíbrio osmótico e conseqüente lise bacteriana, ocorrendo assim liberação das partículas infectivas do fago para o meio circundante (Moineau, 2005).

Fagos temperados podem incorporar seu material genético ao cromossomo do hospedeiro ou ainda permanecer como um plasmídeo na célula. Este material genético é replicado juntamente com o genoma bacteriano e repassado para as células-filhas a cada divisão celular. Ele é mantido até que condições específicas estimulem sua excisão e posterior expressão, caracterizando o início do ciclo lítico. A condição de lisogenia é comum em *Lactococcus* (Davidson et al., 1990) e *Lactobacillus* (Sechaud et al., 1988), e em indústrias de produtos lácticos pode ser responsável por falhas fermentativas por destruição das culturas de Bactérias Lácticas (Shimizu-Kodata et al., 1983).

Indústrias baseadas em fermentações bacterianas em larga-escala podem ser divididas em três classes, representando maiores níveis de pureza de cultura e esterilidade de meios: produção alimentícia, produtos químicos e indústrias farmacêuticas e de biotecnologia. Segundo Bogosian (2006), na indústria alimentícia, o número de fermentações lácticas perdidas em decorrência de contaminações por bacteriófagos tem sido estimado na faixa de 1 a 10%. A ocorrência de contaminações está associada às condições não-estéreis empregadas ou ao uso de matérias-primas contaminadas.

Em 2001, 1023 linhagens de células de Bactérias Lácticas eram usadas para as fermentações em todo o mundo. Dentre elas estão vários gêneros economicamente significativos e espécies que incluem *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus thermophilus* (McGrath et al., 2002). Com esse uso comercial extensivo, o interesse no estudo destas bactérias cresceu consideravelmente (Moineau, 2002).

O desenvolvimento de fermentos pode ser afetado por uma série de fatores ambientais, tais como a presença de inibidores de crescimento, restos de desinfetantes nos equipamentos e por contaminação por bacteriófagos. A presença de qualquer um desses fatores resulta em falha na fermentação ou, no mínimo, na geração de produtos de baixa qualidade, com consequentes perdas econômicas (Josephsen & Neve, 1998).

Na década de 1930, H. R. Whitehead e G. A. Cox, do Instituto de Pesquisa Láctica da Nova Zelândia, descobriram que bacteriófagos que infectam *L. lactis* constituíam a principal causa de falhas na fermentação do leite. Atualmente, a infecção por fagos de culturas “starter” constitui reconhecidamente a principal causa de fermentação falha ou lenta na indústria de laticínios (Dinsmore et al., 1998, McGrath et al., 2004). Ataques por fagos levam a variações de gosto e textura entre produtos, e até mesmo a falhas completas de fermentação (Moineau et al., 2002).

Os fagos podem ser transferidos de uma fermentação para a próxima via soro, aerosol, poeira, etc. Os tanques de fermentação são estruturas de grande porte e o leite usado para o preparo do queijo muitas vezes não pode ser aquecido o suficiente para destruir os fagos sem que ocorra uma diminuição na qualidade do produto (Bogosian, 2006). Processos fermentativos contaminados significam tanto a perda do produto como da matéria-prima utilizada na preparação do meio de cultura. Além disso, ainda há prejuízo pelos custos associados à limpeza e à perda de tempo nas indústrias. Investigações de controle de qualidade e a implementação de planos de ação corretiva estão adicionados aos custos associados com o surto de bacteriófagos (Bogosian, 2006).

Na tentativa de conter as contaminações por bacteriófagos, uma variedade de práticas têm sido desenvolvidas, dentre elas a adaptação de indústrias, aumento da higienização, mudanças de processos, meios de crescimento seletivos, rotação de culturas, e desenvolvimento de linhagens resistentes a fagos (Moineau et al., 2002; del Rio et al., 2007).

Atualmente, um grande número de fagos de bactérias do leite tem sido caracterizado por meio de diversas técnicas, incluindo a microscopia eletrônica (McGrath et al., 2004), o perfil de proteínas (Dinsmore et al., 1998), sorologia (McGrath et al., 2004), hibridação DNA-DNA (Nielsen et al., 1987; Josephsen et al., 1998), padrões de digestão enzimática (Oliveira et al., 1995; Madera et al., 2004), PCR (del Rio et al., 2007; Binetti et al., 2008), sequenciamento genômico (Dinsmore et al., 1998; del Rio et al., 2007) e até mesmo sistemas de detecção “online” e biosensores (McGrath et al., 2002).

O advento de ferramentas para a pesquisa em biologia molecular, como sequenciadores automáticos de DNA e bioinformática, tem permitido uma análise detalhada de um número cada vez maior de genomas de bacteriófagos o que, por sua vez, facilita o desenvolvimento e otimização de ferramentas genéticas tanto para pesquisa de base como para a obtenção de cepas bacterianas resistentes (McGrath et al., 2002). Embora estes avanços, em conjunção com programas de sanitização, tenham reduzido a incidência de infecções por bacteriófagos, eles certamente não as eliminaram (McGrath et al., 2004). Assim, a identificação e caracterização de fagos de Bactérias Lácticas são consideradas de grande importância na indústria para a melhoria de seus sistemas de prevenção e controle de infecções.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

Este estudo foi conduzido no Laboratório de Immunovirologia Molecular e Glicoimunologia do Departamento de Biologia Geral e no Centro de Microscopia e Microanálise (NMM) da Universidade Federal de Viçosa.

#### **3.1 AMOSTRAGEM**

Neste estudo foram utilizadas amostras de soro resultantes de processos fermentativos para produção de queijos em laticínios da Zona da Mata Mineira. Em cada uma delas foram coletados três litros do soro resultante de fermentações, falhas ou não, que utilizaram culturas de *Lactococcus lactis*.

**Tabela 1** – Amostras de soro de queijo coletadas em laticínios da Zona da Mata Mineira

<i>Laticínio</i>	<i>Amostra</i>	<i>Produto da Fermentação</i>
A	01	Queijo Mussarela*
	02	Queijo Mussarela*
	03	Queijo Cottage
B	04	Queijo Mussarela
C	05	Queijo Minas Frescal

\* Soros obtidos de fermentações distintas.

Em geral, a coleta do soro ocorreu após o processo completo de fermentação. Apenas a amostra 03 foi coletada a partir de um processo em que ocorreu falha fermentativa, ou seja, o pH desejado não havia sido alcançado após o término do tempo de fermentação determinado pelo Laticínio. Portanto, coletaram-se 3 litros do leite que seria descartado devido a esta falha.

Após a coleta, a amostra 03 foi deixada por dois dias a 37 °C para a obtenção do soro e, em seguida, todas as amostras foram centrifugadas para remoção do excesso de gordura e posteriormente filtradas.

### 3.2 ISOLAMENTO DE BACTERIÓFAGOS

O meio de cultura para manutenção das culturas bacterianas foi o meio líquido LDR 12% (Leite Desnatado Reconstituído). Além disso, foi utilizado o meio M17 (HIMEDIA, USA) líquido, semi-sólido (0,7% ágar) e sólido (1,5% ágar) - (Sambrook e Russell, 2001), ou meio M17 acrescido de Glicose a 0,5 % (meio GM17).

As amostras de soro foram centrifugadas a 3.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado em membrana 0,45 µm para eliminação de restos bacterianos. As partículas virais foram, em seguida, precipitadas com 10%

Polietilenoglicol (PEG) 8.000 e 1,0 M NaCl por 48 horas a 4 °C e centrifugadas a 11.000 g por 20 minutos. O precipitado foi ressuspenso em 2 mL de tampão SM (0,1 M NaCl; 0,01 M MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,05 M Tris–Cl, pH 7,5) (Sambrook e Russell, 2001) seguindo-se a adição de igual volume de clorofórmio. Após decantação e centrifugação (4.000 g, por 10 minutos) a 4°C, a fase aquosa contendo os fagos foi transferida para microtubos de 1,5mL. Este concentrado foi a fonte de bacteriófagos utilizada para o plaqueamento.

O plaqueamento de bactérias foi realizado utilizando-se culturas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (cepa H16) e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (cepa R14) em fase exponencial de crescimento para cada concentrado viral.

Uma alíquota de 300 µL do concentrado viral foi misturada a 200 µL de cada cultura bacteriana e a suspensão resultante foi incubada por 20 minutos a 30 °C. A mistura foi transferida para tubos contendo 3 mL de meio M17 semi-sólido, fundido, a 45 °C. Após agitação manual, a mistura foi vertida em placa de Petri contendo meio M17 solidificado. As placas foram incubadas por 18 horas a 30 °C. Placas de lise individuais foram utilizadas como fonte para propagação dos fagos em cultura líquida. Este protocolo foi repetido ao menos duas vezes para garantir o isolamento do fago.

De acordo com o resultado do isolamento, 1 mL da cultura bacteriana em fase log de crescimento foi inoculada em 100 mL de meio GM17 contendo CaCl<sub>2</sub> 10 mM e incubada até atingir uma densidade óptica (D.O.<sub>600</sub>) de 0,6. A suspensão de células resultante foi infectada com o concentrado viral em uma multiplicidade de infecção de 0.1 para 1 e incubada a 30 °C por 30 horas. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 10.000 g durante 15 minutos e filtrada em membrana de 0,22 µm. O filtrado foi utilizado para os ensaios de extração e análise genômica. Uma alíquota de 50 mL foi retirada e, a partir dela, as partículas virais foram precipitadas com 10% PEG 8.000 e 1,0 M NaCl por 48 horas a 4 °C e centrifugadas a 11.000 g por 20 minutos. O sedimento foi ressuspenso em 1 mL de tampão, o PEG foi retirado pelo tratamento com clorofórmio e a suspensão

final foi estocada a 4 °C para ser utilizada, posteriormente, para os ensaios de perfil protéico e microscopia eletrônica.

### 3.3 ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E IDENTIFICAÇÃO

#### 3.3.1 Extração do genoma viral

A extração genômica viral foi realizada como descrito por Sambrook e Russell (2001). Um volume de 750 µL de cada amostra contendo os bacteriófagos foi tratado com proteinase K 50 µg/mL e SDS 0,5%, seguindo-se incubação a 56 °C por 90 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, os tubos foram tratados em duas etapas – a primeira utilizando igual volume de fenol-clorofórmio 1:1 e a última com a adição de clorofórmio puro. Após a transferência da fase aquosa para novos tubos, o conteúdo foi precipitado por meio da adição de igual volume de isopropanol, incubação a 4 °C por duas horas e centrifugação a 11.000 g por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento, após secagem por meia hora à temperatura ambiente, foi ressuscitado em água Milli-Q autoclavada. O ácido nucleico obtido foi avaliado em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta. Para a análise da composição do genoma viral, o conteúdo extraído foi submetido à digestão por DNase I 1 µg/mL ou RNase A 1 µg/mL durante 60 minutos a 37 °C, antes de ser submetido à eletroforese em gel de agarose como descrito anteriormente.

### **3.3.2 Eletroforese em Gel em Campo Pulsado**

O tamanho do genoma dos isolados foi estimado por meio de eletroforese em gel em campo pulsado. Para isso, 20 µL do DNA extraído foram adicionados a 20 µL de tampão TBE 2,0%. As amostras foram então submetidas a uma eletroforese em gel de agarose 1,0% em campo pulsado a 6 V/cm<sup>2</sup>, sob ângulo de 120 graus, com tempo de troca de 1 a 6 segundos a 14 °C. Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultra-violeta.

### **3.3.3 Análises com Enzimas de Restrição**

As digestões enzimáticas foram realizadas utilizando-se as enzimas *EcoR* I, *Hind* III e *BamH* I (Fermentas) e *Hae* III (Invitrogen), de acordo com a recomendação dos fabricantes. Para isto, até 1 µg do DNA viral foi adicionado a uma mistura contendo o tampão enzimático e água. Esta mistura foi levada ao banho-maria a 80 °C por 10 minutos e então a 37°C por 10 minutos e, em seguida, 1 U da respectiva enzima foi adicionada. A mistura foi incubada por 3 horas a 37 °C e submetida a uma eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e o DNA foi visualizado sob luz ultravioleta.

### 3.3.4 Amplificação (Multiplex PCR)

Os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos segmentos do genoma de cada bacteriófago isolado foram aqueles descritos por del Rio e colaboradores (2007) para regiões conservadas dos três principais grupos conhecidos de fagos de *Lactococcus lactis* (tabela 2).

**Tabela 2** – *Primers* utilizados para classificação dos bacteriófagos isolados

Oligonucleotídeo	Sequência	Amplicon (pb)
335A	5' GAAGCTAGGCGAATCAGTAACTTGCTAG 3'	196
335B	5' CGGCTATCTCGTCAATTGTTCCGGTTGC 3'	
936A	5' ATCAGTTGGCTCAATGGAAGACCAAGCGG 3'	318
936B	5' GTTGCTTCTGCTGTTGGTGTCAAATGAGGA 3'	
c2A	5' CAATCGAAGCAGGTGTAAGTTTCGAGAAC 3'	444
c2B	5' GCTTTATCCATTTGTAGGTATGCTTCTGCC 3'	

Para a amplificação das sequências a partir do DNA extraído foi utilizada uma mistura de 5 µg de DNA, tampão especial para PCR (Phoneutria), dNTP 0,5 mM, 0,2 pmol de cada *primer*, 1,5 U de Taq DNA Polimerase (Phoneutria) e o volume de 20 µL foi completado com água Milli-Q. As misturas foram colocadas em um termociclador MasterCycler Personal (Eppendorf) e os produtos amplificados através do seguinte protocolo: 94 °C por 3 minutos para a desnaturação inicial das fitas, 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 50 °C por um minuto e 72 °C por um minuto e, por fim, uma extensão final a 72 °C por 7 minutos. O resultado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta.

### 3.3.5 Sequenciamento e Análise de Distanciamento Genético

Os produtos de PCR foram clonados em vetor de clonagem pGEM-T Easy Vector System (PROMEGA) de acordo com as recomendações do fabricante. Para amplificação dos plasmídeos gerados, células de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  competentes foram transformadas por meio de choque térmico a 42 °C por 90 segundos, recuperadas em meio LB a 37 °C e 180 rpm por 2 horas e plaqueadas em meio seletivo contendo ampicilina a 50  $\mu$ g/mL. A presença do inserto nas colônias selecionadas foi confirmada por meio de PCR. Para isto, foram utilizados os *primers* relativos à sequência clonada, de acordo com o protocolo descrito no item anterior. Uma alíquota das colônias selecionadas foi congelada e mantida a -80 °C e outra foi utilizada para extração e purificação do DNA plasmidial.

As colônias recombinantes selecionadas foram cultivadas separadamente em 5 mL de meio LB/Ampicilina (50  $\mu$ g/mL) durante 16 horas a 37 °C e 180 rpm. O DNA plasmidial dessas colônias foi extraído utilizando-se o kit Wizard® Plus SV Minipreps (PROMEGA), de acordo com as orientações do fabricante. Para isto, 3 mL de cada uma destas soluções foi centrifugado e seu sobrenadante foi descartado. O sedimento foi suspenso em 250  $\mu$ L de solução de suspensão celular e, em seguida, foram adicionados a ela 250  $\mu$ L de solução de lise celular e 10  $\mu$ L de Protease Alcalina. O conteúdo foi incubado por até 5 minutos à temperatura ambiente e, após adição da solução de neutralização, os tubos foram centrifugados e o sobrenadante foi transferido para membranas onde o DNA foi retido. Após duas lavagens destas membranas utilizando solução de lavagem, o DNA foi eluído em 40  $\mu$ L de água Milli-Q a 80 °C. Para confirmar a presença dos insertos foram realizados ensaios utilizando a enzima *EcoR* I, segundo as recomendações do fabricante.

O DNA plasmidial foi enviado para sequenciamento no Laboratório de Genômica da Universidade Federal de Viçosa, utilizando como *primer* uma sequência do plasmídeo comercial utilizado.

As análises filogenéticas foram realizadas em matrizes de sequências alinhadas pelo software BLAST e posteriormente analisadas pelo CLUSTALW, utilizando a opção “neighbor-joining and bootstrap.

### **3.3.6 Determinação do perfil de proteínas**

O padrão de proteínas totais de cada bacteriófago foi obtido a partir de eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes, conforme descrito por Sambrook and Russell, 2001. Para isso, 10 µL da suspensão de fagos foram adicionados de 15 µL do tampão de amostra redutor (Tris-HCl 50 mM; glicerol 10%; SDS 2%; azul de bromofenol 0,1%, uréia 4 M; mercaptanol 0,5 mL) e incubados a 95 °C por 5 minutos. As amostras e o marcador de peso molecular foram aplicados em géis de poliacrilamida 1,5 mm a 15% e a eletroforese conduzida em tampão de corrida (Tris 25 mM; EDTA 1,95 mM; glicina 0,12 M; SDS 0,1%; pH 8,3) sob corrente constante de 80 V durante 5 horas. As bandas protéicas foram visualizadas após coloração pelo método da prata amoniaca. Para tanto, a eletroforese foi interrompida e o gel rapidamente lavado com água destilada e fixado por 1 hora em uma solução com 50% de metanol e 12% de ácido acético. Após a fixação, o gel foi deixado por 1 minuto em solução tiosulfato de sódio 0,02%, lavado 3 vezes com água destilada e incubado em uma solução de prata amoniaca a 3% por 1 hora em uma câmara escura. Após incubação, o gel foi revelado em uma solução contendo 48 mL de Carbonato de sódio 6%, 100 µL de formaldeído e 1,5 mL de Tiosulfato de sódio 0,02% e a reação foi interrompida adicionando-se ácido acético glacial.

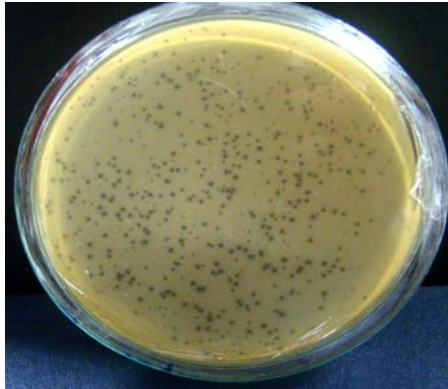
### **3.3.7 Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Uma alíquota de 1  $\mu$ L da solução contendo os fagos foi aplicada sobre uma tela de microscopia eletrônica (MET) de 200 mesh, de cobre, previamente revestida com FORMVAR®. As telas foram incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos e secas. Cada tela foi corada com acetato de uranila 2% e incubada à temperatura ambiente pelo tempo mínimo de 40 minutos, procedendo-se a deposição da tela na caixa de armazenamento. As telas foram submetidas à Microscopia Eletrônica de Transmissão, no Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da UFV e os dados foram analisados posteriormente para avaliação dos comprimentos totais, comprimentos das caudas e diâmetros dos capsídeos de cada bacteriófago. Quando necessário, diluições da solução foram realizadas para a obtenção de imagens com maior qualidade.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ISOLAMENTO DE BACTERIÓFAGOS

Todas as três amostras coletadas no Laticínio A propiciaram a obtenção de placas de lise, tanto em colônias de *L. lactis* subsp. *lactis* quanto de *L. lactis* subsp. *cremoris* (Figura 1). Não foram obtidas placas de lise a partir das amostras coletadas nos laticínios B e C. Um segundo isolamento foi realizado a partir de cada placa de lise obtida. Cada uma delas foi novamente incubada com ambas as estirpes H16 e R14, porém nenhuma delas foi capaz de gerar novas placas de lise em ambas as estirpes durante o segundo isolamento. Assim, 17 isolados foram obtidos, todos provenientes do Laticínio A (Tabela 3). Porém, existe a possibilidade de que os bacteriófagos isolados a partir de uma mesma placa durante o segundo isolamento sejam provenientes de um único bacteriófago, uma vez que foram provenientes de uma mesma placa de lise.



**Figura 1** – Placas de lise obtidas a partir do soro 03 coletado no Laticínio A

Houve a formação de placas de lise nas placas contendo os soros resultantes das amostras coletadas no Laticínio A, tanto nas placas contendo colônias de *L. lactis* subsp. *lactis* quanto de *L. lactis* subsp. *cremoris* (Tabela 3). O mesmo não foi observado para as placas contendo os soros provenientes dos Laticínios B e C. Um segundo isolamento foi realizado a partir de cada placa de lise obtida. Cada uma delas foi novamente incubada com ambas as estirpes H16 e R14, porém nenhuma delas foi capaz de gerar novas placas de lise em ambas as estirpes durante o segundo isolamento. Assim, 17 isolados foram obtidos, todos pertencentes ao Laticínio A. Porém, existe a possibilidade de que os isolados obtidos a partir de uma mesma placa durante o segundo isolamento sejam provenientes de um único bacteriófago.

**Tabela 3** – Número de placas de lise isoladas a partir das amostras coletadas e seus hospedeiros

<i>Amostra</i>	<i>Laticínio</i>	<i>N.º de placas de lise isoladas</i>	<i>Identificação</i>	<i>Hospedeiro</i>
01	A	3	18.1 (LIMG3) 18.2 (LIMG4) 18.3 (LIMG5)	R14 R14 R14
02	A	12	11.1 (LIMG6) 12.1 – 12.7 (LIMG7-13) 19.1-19.3 (LIMG14-16) 32.1 (LIMG17)	H16 H16 R14 R14
03	A	2	20.1 – LIMG1 23.1 – LIMG2	R14 R14
04	B	-	-	
05	C	-	-	

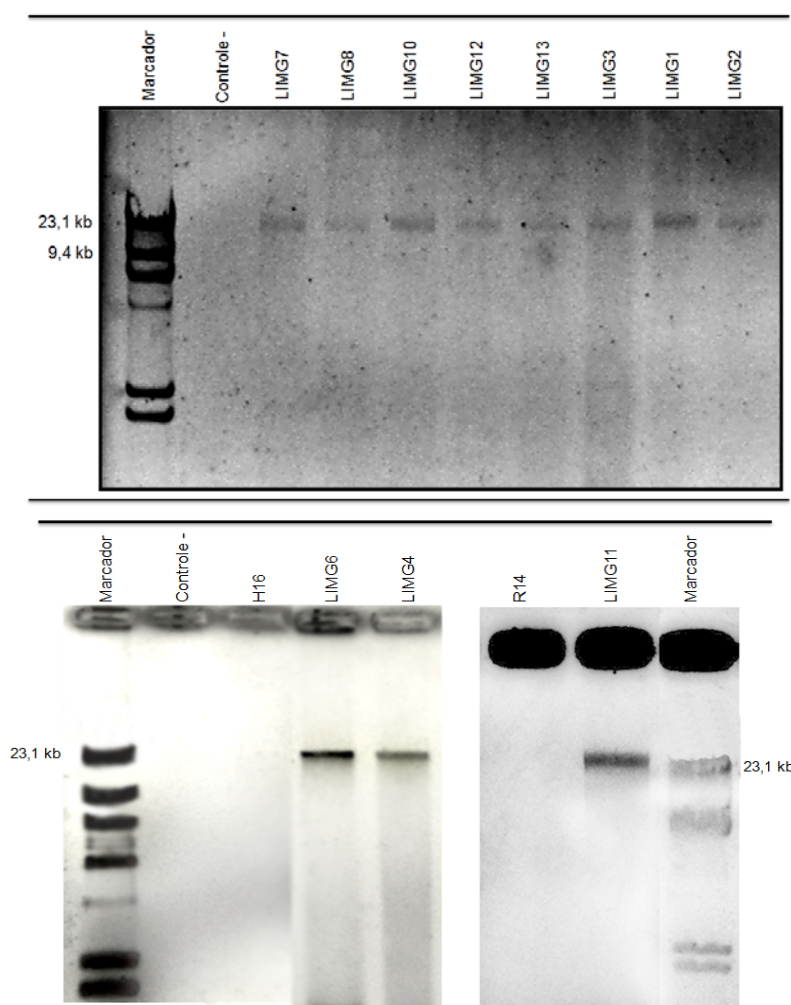
A nomeação de cada bacteriófago isolado seguiu sua ordem de isolamento, precedida pela abreviatura LIMG, relativa a Laboratório de Immunovirologia Molecular e Glicoimunologia.

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E IDENTIFICAÇÃO

### 4.2.1 Genoma viral

Para a propagação dos bacteriófagos foram utilizados três controles: o primeiro contendo somente o meio (controle negativo: C-), o segundo contendo a cepa H16 sem fagos e a última contendo a cepa R14 sem fagos. Dentre os bacteriófagos isolados neste trabalho, 11 foram propagados com sucesso, sendo eles: LIMG1 e LIMG2 (amostra 03), LIMG3 e LIMG4 (amostra 01) e LIMG6-8 e LIMG10-13 (amostra 02). Após filtração em membrana 0,22 µm, a extração do genoma viral foi realizada para todas as amostras propagadas e também para os controles. As amostras foram então

submetidas a uma eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta (Figura 2).

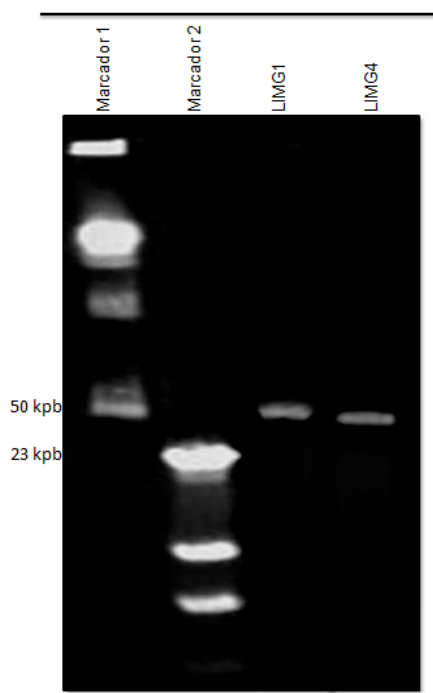


**Figura 2** – Genoma viral extraído a partir dos bacteriófagos isolados e submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8%.

Após extração do genoma viral foram realizados ensaios de digestão com as enzimas DNase I e RNase A. O genoma de todos os isolados é composto por DNA, uma vez que o tratamento com a enzima DNase I provocou sua degradação. Como esperado, o tratamento com a enzima RNase A não teve efeito algum sobre o genoma extraído.

Através de uma eletroforese em campo pulsado foi constatado que os genomas dos isolados LIMG1 e LIMG4 possuem aproximadamente 48 kpb e 42 kpb, respectivamente. O DNA extraído do restante dos isolados

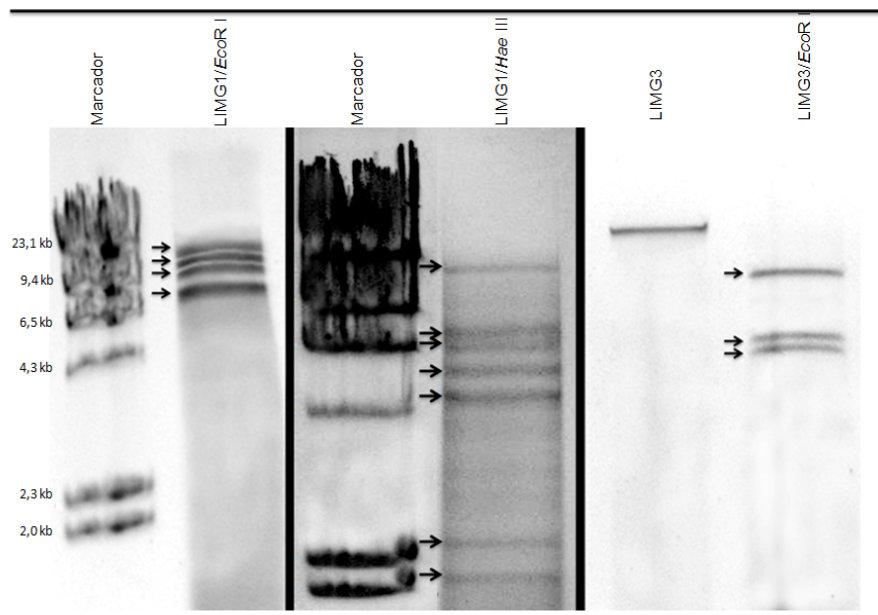
não estava em concentração suficientemente alta para a realização deste ensaio e, por isso, não foi possível a determinação de seu comprimento.



**Figura 3** – Eletroforese em campo pulsado para estimativa do tamanho do genoma dos isolados LIMG1 e LIMG4.

#### 4.2.2 Análise de Restrição

Após a clivagem do genoma do isolado LIMG1 pelas enzimas *EcoR* I e *Hae* III foram encontrados quatro (19,0; 12,0; 9,0; 7,5 kb) e sete (20,0; 7,5; 6,5; 5,0; 4,5; 2,5; 2,1 kb) fragmentos, respectivamente, enquanto a clivagem do genoma do isolado LIMG3 pela enzima *EcoR* I gerou três fragmentos (20,0; 6,7; 6,3 kb) (Figura 4). As demais reações de clivagem realizadas resultaram em apenas um fragmento. Todas as reações foram repetidas pelo menos duas vezes para cada isolado.



**Figura 4** – Perfil de clivagem enzimática do bacteriófago LIMG1 pelas enzimas *EcoR* I e *Hae* III e do bacteriófago LIMG3 pela enzima *EcoR* I.

Loof et al. (1983) realizou o perfil de digestão enzimática do bacteriófago lactocócico P008, o qual faz parte do grupo 936. Embora análises por bioinformática tenham revelado um número predito de 10 fragmentos resultantes da clivagem do genoma deste fago pela enzima *Hind* III (Coveney e colaboradores, 1987), apenas um fragmento foi observado nos ensaios laboratoriais, assim como ocorreu para grande parte das clivagens neste trabalho. O mesmo resultado foi obtido por Oliveira e colaboradores (1995) em relação ao genoma de seus isolados.

As clivagens do genoma do isolado LIMG1 pelas enzimas *EcoR* I e *Hae* III deram origem a quatro e sete fragmentos principais, respectivamente, enquanto que a clivagem do isolado LIMG3 pela enzima *EcoR* I deu origem a três. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Loof e colaboradores para o bacteriófago P008. Eles obtiveram um perfil composto por 4 e 6 fragmentos a partir da clivagem do genoma deste fago pelas enzimas *EcoR* I e *Hae* III, respectivamente. Oliveira e colaboradores também obtiveram resultados semelhantes ao submeterem

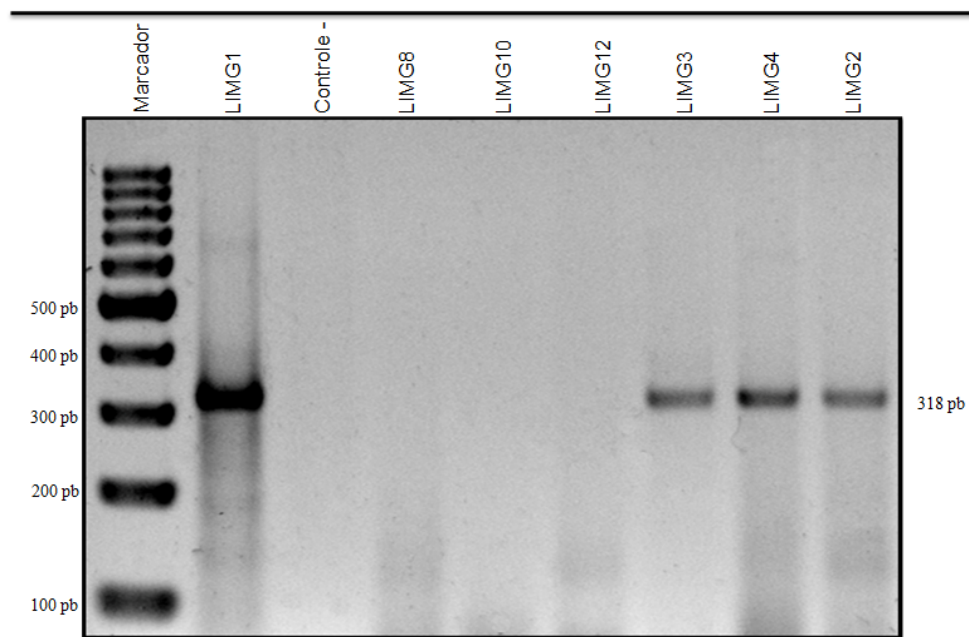
os genomas de seus isolados a clivagens pela enzima *EcoR* I, a qual gerou perfis contendo de 3 a 5 fragmentos de DNA.

Após a análise dos fragmentos gerados pelas clivagens pôde-se confirmar o comprimento de 48 kpb estimado na Eletroforese em Campo Pulsado para o bacteriófago LIMG1. Em seu perfil de restrição pelas enzimas *EcoR* I e *Hae* III foram observados 4 e 7 fragmentos, respectivamente, e as somas de seus tamanhos resultou em cerca de 48-50 kpb. Assim, considerando os erros relativos ao processo, pôde-se confirmar que o isolado LIMG1 possui um genoma de aproximadamente 48 kpb.

#### **4.2.3 Amplificação por Multiplex PCR**

Os isolados LIMG1 e LIMG2 (amostra 03) e LIMG3 e LIMG4 (amostra 01) tiveram uma parte de seu genoma amplificado e um fragmento de aproximadamente 320 pb foi obtido (Figura 5). Assim, de acordo com del Rio (2007), estes isolados pertencem ao grande grupo de bacteriófagos do tipo 936, família *Siphoviridae*. Estes bacteriófagos representam a maioria dos fagos isolados em Laticínios de países como a Argentina, Nova Zelândia e nos Estados Unidos (Raiski & Belayasova, 2009) e são compostos por uma cabeça isométrica pequena, seguida por um colar e uma cauda longa não-contráctil, além de possuírem um genoma de DNA linear fita dupla de cerca de 30 kpb, com extremidades coesivas. Alguns representantes deste grupo são os fagos P008, com 29,7 kb (Jarvis, 1991); bLI170, com 31,8 kb (Crutz Le-Coq, 2002); BIBB29: 29,3 kb (Hejnowicz, 2008); e sk1: 28,4 kb (Chandry, 1997);

Os bacteriófagos LIMG1 e LIMG4, portanto, contêm o maior genoma registrado até então para membros do grupo de fagos do tipo 936. Assim, este trabalho consiste no primeiro relato de membros deste grupo de fagos com genoma contendo mais de 40,0 kb.



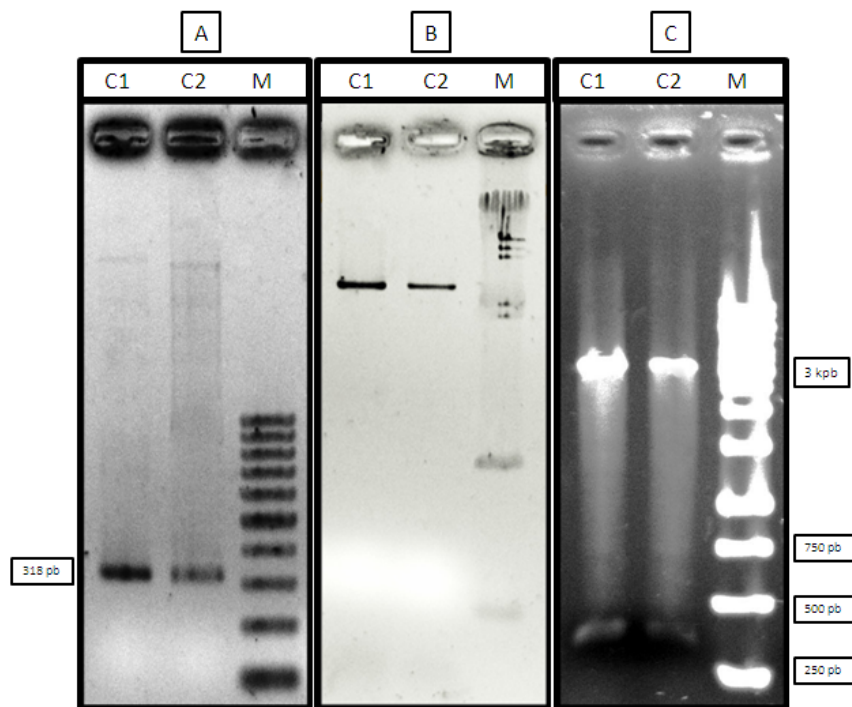
**Figura 5** – Multiplex PCR para identificação dos bacteriófagos isolados.

A banda de 318 pb resultante da amplificação de parte do genoma dos isolados LIMG1, LIMG2, LIMG3 e LIMG4 indica que estes isolados são membros do grupo de fagos do tipo 936.

Não houve amplificação dos controles negativos e das sequências do restante dos isolados. Assim, estes fagos podem pertencer a outros grupos menos comuns de bacteriófagos de *Lactococcus lactis* ou possuírem alterações genômicas que impediram o anelamento correto dos *primers* durante a reação. Esta última hipótese deve ser considerada, já que os *primers* utilizados foram desenhados baseados em sequências de bacteriófagos isolados principalmente em países europeus. À medida que um maior número de bacteriófagos tiver seus genomas sequenciados, novos oligonucleotídeos deverão ser testados e validados.

#### 4.2.4 Sequenciamento

Foram obtidas duas colônias recombinantes a partir do inserto da amostra LIMG1, e uma reação de PCR confirmou a presença do inserto (Figura 6A). Procedeu-se a extração do DNA plasmidial e sua purificação (Figura 6B). O plasmídeo extraído foi clivado com a enzima *EcoR* I e o fragmento gerado foi de pouco mais de 400 pb (Figura 6C), consistente com o tamanho do fragmento inserido (318 pb) acrescido de parte do genoma plasmidial clivado pela enzima (122 pb).



**Figura 6** – Confirmação da transformação de bactérias DH5 $\alpha$  com a sequência de DNA viral amplificada.

A: Amplificação da sequência clonada após seleção das bactérias recombinantes; (C1 e C2: colônias transformadas; M – Marcador Molecular de 100 pb); B: Extração plasmidial (M – Marcador molecular: DNA genômico do fago  $\lambda$  clivado com *Hind* III); C: Clivagem do DNA plasmidial com a enzima *EcoR* I (M – Marcador molecular de 1.000 pb). Fragmentos de 400 pb correspondentes à sequência clonada adicionada de parte do genoma plasmidial.

Através da análise pelo software BLAST, sequências contidas no GeneBank para diferentes bacteriófagos do grupo 936 foram alinhadas apresentando alta identidade, como mostra a tabela 04. Porém, duas mutações pontuais puderam ser observadas, como evidenciado na Figura 07.

**Tabela 4** – Isolados cujas sequências foram alinhadas com o fragmento obtido para o fago LIMG1

Isolado	GeneBank	Ano*	Origem	Grupo	Identidade
sk1	AF011378.1	1997	Austrália	936	93%
P008	AF011378.1	2006	Alemanha	936	91%
p2	GQ979703.1	2010	Canadá	936	90%
SL4	FJ848881.1	2009	Canadá	936	93%
bIL170	AF009630.1	2002	França	936	95%
bIBB29	EU221285.1	2009	Polônia	936	93%
CB19	FJ848885.1	2009	Canadá	936	95%
CB13	ACU46826.1	2009	Canadá	936	96%
CB14	ACU46881.1	2009	Canadá	936	96%
Q7	AAF85635.1	2000	Canadá	936	94%
Q42	AAF85634.1	2000	Canadá	936	96%
F4-1	P26596.1	2009	EUA	936	96%
712	ABB77578.1	2006	Irlanda	936	91%
jj50	ABB77632.1	2006	Irlanda	936	90%
P335	DQ838728.1	2008	França	P335	17%
c2	L48605.1	1996	Nova Zelândia	c2	10%

\*Ano de publicação da sequência no banco de dados do GeneBank.

```

sk1      TNSYPADDVPDHGVKKGATLLQEMVFIQT DQALKEDILGQORTENGLGWSPTGNWKTTC 60
Q42     TNSYPADDVPDHGVKKGATLLQEMVFIQT DQALKEDILGQORTENGLGWSPTGNWKTTC 60
F4-1    TNSYPADDVPDHGVKKGATLLQEMVFIQT DQALKEDILGQORTENGLGWSPTGNWKTTC 60
bIL170  TNSYPADDVPDHGVKKGATLLQEMVFIQT DQALKEDILGQORTANGLGWSPTGNWKTTC 60
SL4     TNSYPADDVPDHGVKKGATLLQEMVFIQT DQALKEDILGQORTANGLGWSPTGNWKAAC 60
CB13    TNSYPADDVPDHGVKKGATLLQEMVFIQT DQALKEDILGQORTANGLGWSPTGNWKTTC 60
CB14    TNSYPADDVPDHGVKKGATLLQEMVFIQT DQALKEDILGQORTANGLGWSPTGNWKTTC 60
LIMG1   TNSYPADDVPDHGVKKGATVLLQEMVFIQT DQALKEDILGQORTENGLGWSPTGNWKTTC 60
CB19    TNSYPADDVPDHGVKKGATLLQEMVFIQT DQALKEDILGQORTENGLGWSPTGNWKTTC 60
bIBB29  TNSYPADDVPDHGVKKGATLLQEMVFIQT DQALKEDILGQORTANGLGWSPTGNWKTTC 60
P008    TNSYPADDVPDHGVKKGATLLQEMVFIQT DQALKEDILGQORTANGLGWSPTGNWKTTC 60
Q7      TNSYPADDVPDHGVKKGATLLQEMVFIQT DQALKEDILGQORTANGLGWSPTGNWKTTC 60
p2      TNSYPADDVPDHGVKKGATLLQEMVFIQT DQALKEDMLGQORTENGLGWSPTGNWKTTC 60
712     TNSYPADDVPDHGVKKGATLLQEMVFIQT DQALKEDMLGQORTSNGLGWSPTGNWKTTC 60
jj50    TNSYPADDVPDHGVKKGSTLLQEMVFIQT DQALKEDMLGQORTSNGLGWSPTGNWKTTC 60
** *****:.:*****:***** ***** **

```

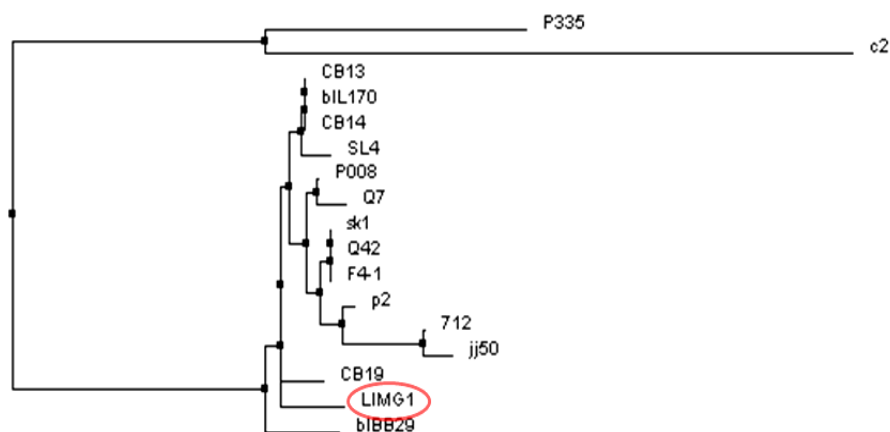
```

sk1      VQYLIKGRKRDKVTGEFVDGYRVVVY 86
Q42     VQYLIKGRKRDKVTGEFVDGYRVVVY 86
F4-1    VQYLIKGRKRDKVTGEFVDGYRVVVY 86
bIL170  VQYLIKGRKRDKVTGEFIDGYRVVVY 86
SL4     VQYLIKGRKRDKVTGEFIDGYRVVVY 86
CB13    VQYLIKGRKRDKVTGEFIDGYRVVVY 86
CB14    VQYLIKGRKRDKVTGEFIDGYRVVVY 86
LIMG1   VQYLIKGRKRDKVTGEFIDGYRVVVY 86
CB19    VQYLIKGRKRDKVTGEFIDGYRVVVY 86
bIBB29  VQYLIKGRKRDKVTGEFIDGYRVVVY 86
P008    VQYLIKGRKRDKVTGEFVDGYRVVVY 86
Q7      VQYLIKGRKRDKITGEFVDGYRVVVY 86
p2      VQYLIKGRKRDKVTGEFVDGYRVVVY 86
712     VQYLLKGRKRDKVTGEFVDGWRVVVY 86
jj50    VQYLLKGRKRDKVTGEFVDGWRVVVY 86
****:*****:*****:*****

```

**Figura 7** – Alinhamento de seqüências entre o isolado LIMG1 e outros fagos do grupo 936.

As seqüências alinhadas foram analisadas através do software CLUSTALW juntamente com as seqüências correspondentes dos fagos P335 e c2, principais representantes dos respectivos grupos, gerando um filograma baseado nas distâncias evolutivas geradas pelas diferenças entre as seqüências dos isolados pelo método Neighbor Joining (Figura 08).



**Figura 8**– Distância evolutiva resultante do alinhamento das seqüências do isolado LIMG1 e de outros fagos de *Lactococcus* já descritos.

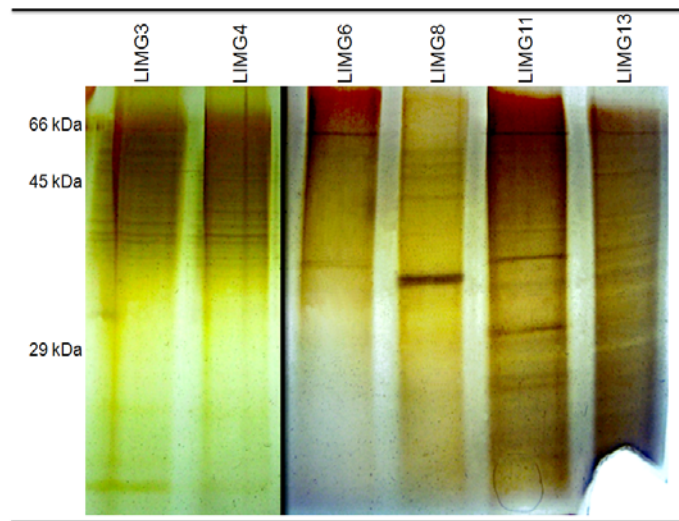
O bacteriófago isolado neste trabalho se manteve agrupado com os demais fagos do grupo 936, como esperado. Porém, pôde ser observado certo distanciamento deste fago em relação à maioria, uma vez que o fragmento do genoma analisado possui as duas mutações pontuais citadas anteriormente. Além disso, a alta identidade de LIMG1 em relação ao isolado BIBB29 também pode residir no fato de haver entre eles uma mutação em comum – onde há um resíduo de serina nos demais bacteriófagos, LIMG1 possui uma arginina, um aminoácido básico, enquanto BIBB29 possui uma isoleucina. Além disso, LIMG1 possui também um resíduo de valina na posição 20 da sequência analisada (Figura 07), enquanto os demais possuem um resíduo de leucina. Devido ao pequeno tamanho do fragmento analisado, poucas alterações se tornam significativas na árvore filogenética, o que é reforçado pelo fato do alto grau de conservação desta sequência entre um mesmo grupo.

#### **4.2.5 Perfil de proteínas**

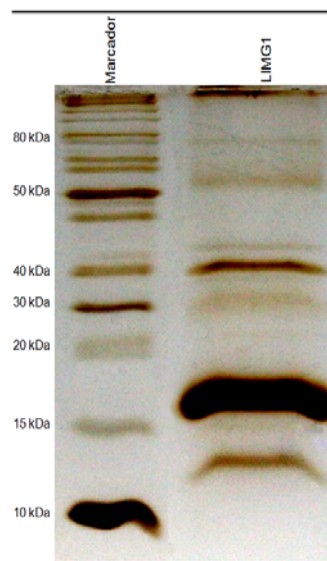
Quatro grupos distintos de bacteriófagos puderam ser diferenciados através de seus perfis proteicos, e sua divisão é condizente com o local de onde foram isolados (Tabela 5). Assim, bacteriófagos isolados a partir de uma mesma amostra apresentaram, em geral, um perfil proteico semelhante. Como controles negativos foram utilizados o meio de cultura não inoculado, o meio contendo a bactéria H16 e o meio contendo a bactéria R14. Todos os controles foram submetidos aos mesmos tratamentos das demais amostras e apresentaram o resultado esperado.

Uma vez que os bacteriófagos LIMG8, LIMG11 e LIMG13 são provenientes de uma mesma placa de lise no isolamento inicial (primeira

repetição), o fato de possuírem perfis distintos reforça a importância da repetição deste processo para a garantia do isolamento de um único fago.



**Figura 9** – Perfil proteico dos bacteriófagos isolados.



**Figura 10** – Perfil proteico do isolado LIMG1.

Crutz-Le Coq, em 2006, realizou uma reconstrução tridimensional da proteína estrutural da cauda de um bacteriófago do grupo 936 e obteve uma equivalência com proteínas globulares de aproximadamente 20 kDa, o que estaria de acordo com a proteína predominante encontrada para o isolado LIMG1, a qual possui aproximadamente 17 kDa (Figura 09).

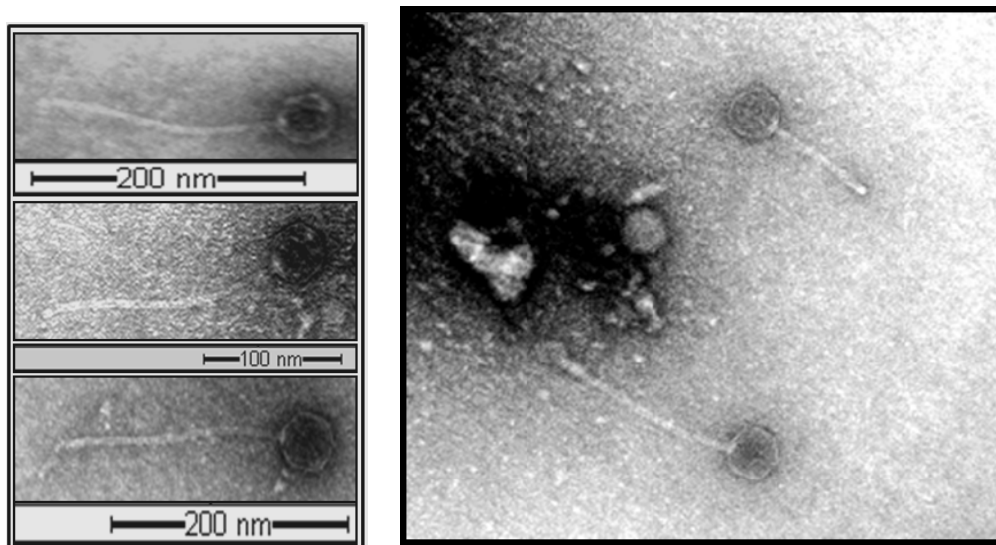
Ainda segundo Cruz-Le Coq, uma proteína estrutural de 38 kDa é o principal componente da cabeça de fagos deste grupo. Assim, o perfil proteico obtido para o isolado LIMG1 corrobora com aqueles obtidos em todos os demais ensaios deste trabalho.

**Tabela 5** – Grupos virais baseados no padrão de perfil de proteínas

Grupo	Bacteriófago	Amostra	Especificidade	Número de bandas principais
1	LIMG1	03	R14	3
2	LIMG3 e LIMG4	01	R14	4
3	LIMG6, LIMG11; LIMG13	02	H16	2
4	LIMG8	02	H16	5

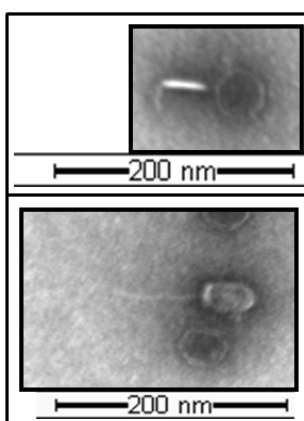
#### 4.2.6 Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Transmissão

O bacteriófago LIMG1 possui um tamanho médio de 230 nm, com uma cauda de 180 nm de comprimento e uma cabeça isométrica com um diâmetro médio de 50 nm, como foi determinado por microscopia eletrônica de transmissão. Nenhuma placa basal foi observada. Essas características são consistentes com as de bacteriófagos do grupo 936. Este grupo possui cabeças isométricas com 45-65 nm de diâmetro, colar, uma cauda de 10-14 nm de diâmetro e 100-200 nm de comprimento, além de ausência de placa basal, diferentemente do grupo de bacteriófagos P335 (Jarvis et al., 1991; Deveau et al., 2006). Variações nas dimensões morfológicas são comuns entre membros de um mesmo grupo e não são determinantes para a classificação destes vírus. No Brasil, o único registro de bacteriófagos de bactérias lácticas a que tivemos acesso foi de fagos isolados por Márcia Rosa de Oliveira e colaboradores, 1995. Eles isolaram 10 diferentes fagos os quais continham cabeças isométricas de 43 nm de diâmetro e caudas de 142 nm de comprimento (Oliveira, 1995).



**Figura 11** – Micrografias Eletrônicas de Transmissão do bacteriófago LIMG1.

Uma segunda micrografia foi realizada utilizando o soro da amostra 03 sem isolamento. Além de estruturas semelhantes à partícula viral LIMG1, também foram verificados bacteriófagos de cabeça isométrica e caudas de menores comprimentos, além da presença rara de bacteriófagos de cabeça alongada (Figura 12). É provável que estes bacteriófagos sejam específicos para outras espécies bacterianas não utilizadas neste trabalho como, por exemplo, *Streptococcus thermophilus* ou *Lactobacillus* sp., os quais são, como *Lactococcus lactis*, fermentos amplamente utilizados em processos fermentativos para produção de queijos e iogurtes.



**Figura 12** – Micrografias Eletrônicas de formas virais encontradas na amostra 03.

## 5 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados pelo presente trabalho pode-se concluir que:

- Dezessete bacteriófagos foram isolados a partir de três amostras coletadas em um laticínio, dos quais onze foram propagados com sucesso; quatro deles em *L. lactis* subsp. *cremoris* e sete em *L. lactis* subsp. *lactis*.
- Os isolados possuem genoma composto por DNA, com cerca de 48 kb (LIMG1) e 42 kb (LIMG4);
- Entre os 17 fagos obtidos, pelo menos quatro pertencem ao grupo 936, família *Siphoviridae*;
- Os fagos LIMG1 consistem de partículas de cabeça isométrica com cerca de 50 nm de diâmetro e caudas longas, sem placa basal, de 230 nm de comprimento;
- Os bacteriófagos isolados foram apresentaram quatro diferentes perfis de proteínas;
- A análise da sequência amplificada para o fago LIMG1 revelou uma alta identidade com outras sequências de fagos do grupo 936.

## 6 PERSPECTIVAS

Análises ainda deverão ser realizadas para o isolado LIMG1, visto que ele foi responsável por um episódio de fermentação falha no Laticínio A. Dentre essas análises estão a purificação e o sequenciamento da região N-terminal da proteína principal do isolado LIMG1, uma componente da cauda de aproximadamente 17 kDa. Considerando-se que este bacteriófago foi isolado a partir de uma fermentação falha para produção de queijo Cottage, percebe-se que o Brasil necessita de programas mais efetivos para o conhecimento, prevenção e controle desses bacteriófagos, visto que a falha nos processos fermentativos pode ocorrer a cada dois meses num mesmo Laticínio, provocando diminuição na qualidade do produto final ou até mesmo sua perda.

O conhecimento acerca das características destes bacteriófagos, assim como de sua estrutura, poderá ser utilizado posteriormente para a confecção de fermentos resistentes através de técnicas de Biologia Molecular ou ainda para a elaboração de estratégias de prevenção de infecções ou descontaminação de ambientes, diminuindo assim os prejuízos causados por esses agentes em indústrias de produtos lácteos em todo o mundo.

## 7 REFERÊNCIAS

Ackermann, H. W. (1998). "Tailed bacteriophages: the order caudovirales." Adv Virus Res **51**: 135-201.

Ackermann, H. W. (2003). "Bacteriophage observations and evolution." Res Microbiol **154**(4): 245-251.

Ackermann, H. W. (2006). Classification of Bacteriophages. The Bacteriophages. R. Calendar, Oxford University Press: 8-16.

Allison, G. E. and T. R. Klaenhammer (1998). "Phage resistance mechanisms in lactic acid bacteria." International Dairy Journal **8**(3): 207-226.

Araújo, W. P. (1998). "Phage typing strains of *Staphylococcus aureus* resistant to antibiotics, isolated from milk." Braz J Vet Res Anim Sci **35**: 161-165.

Binetti, A. G., M. L. Capra, et al. (2008). "PCR method for detection and identification of *Lactobacillus casei/paracasei* bacteriophages in dairy products." Int J Food Microbiol **124**(2): 147-153.

Birge, E. A. (2006). Bacterial and Bacteriophage Genetics, Springer.

Bogosian, G. (2006). Control of Bacteriophage in Commercial Microbiology and Fermentation Facilities. The Bacteriophages. R. Calendar. New York, Oxford University Press: 667-673.

Bradley, D. E. (1967). "Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins." Bacteriol Rev **31**(4): 230-314.

Breitbart, M., J. H. Miyake, et al. (2004). "Global distribution of nearly identical phage-encoded DNA sequences." FEMS Microbiol Lett **236**(2): 249-256.

Breitbart, M. and F. Rohwer (2005). "Here a virus, there a virus, everywhere the same virus?" Trends Microbiol **13**(6): 278-284.

Brussow, H. (2001). "Phages of dairy bacteria." Annu Rev Microbiol **55**: 283-303.

Brussow, H., C. Canchaya, et al. (2004). "Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion." Microbiol Mol Biol Rev **68**(3): 560-602.

Brussow, H., M. Fremont, et al. (1994). "Detection and classification of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from industrial milk fermentation." Appl Environ Microbiol **60**(12): 4537-4543.

Chibani-Chennoufi, S., A. Bruttin, et al. (2004). "Phage-host interaction: an ecological perspective." J Bacteriol **186**(12): 3677-3686.

Cogan, T. M. and J. P. Accolas (1990). Starter cultures: types, metabolism and bacteriophage. Dairy Microbiology R. K. Robinson. London, Elsevier Applied Science Publishers Ltd. **1 - The Microbiology of Milk**: 77-93.

Coveney, J. A., G. F. Fitzgerald, et al. (1987). "Detailed characterization and comparison of four lactic streptococcal bacteriophages based on morphology,

restriction mapping, DNA homology, and structural protein analysis." Appl Environ Microbiol **53**(7): 1439-1447.

Crutz-Le Coq, A. M., F. Cantele, et al. (2006). "Insights into structural proteins of 936-type virulent lactococcal bacteriophages." Arch Virol **151**(6): 1039-1053.

D'Hérelle, F. (1917). "Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysenteriques." C R Acad Sci **165**: 373.

Dabrowska, K., K. Switala-Jelen, et al. (2005). "Bacteriophage penetration in vertebrates." Journal of Applied Microbiology **98**(1): 7-13.

Daly, C., G. F. Fitzgerald, et al. (1996). "Biotechnology of lactic acid bacteria with special reference to bacteriophage resistance." Antonie Van Leeuwenhoek **70**(2-4): 99-110.

Davidson, B. E., I. B. Powell, et al. (1990). "Temperate bacteriophages and lysogeny in lactic acid bacteria." Fems Microbiology Reviews **7**(1-2): 79-90.

del Rio, B., A. G. Binetti, et al. (2007). "Multiplex PCR for the detection and identification of dairy bacteriophages in milk." Food Microbiol **24**(1): 75-81.

Deveau, H., S. J. Labrie, et al. (2006). "Biodiversity and classification of lactococcal phages." Appl Environ Microbiol **72**(6): 4338-4346.

Dinsmore, P. K. and T. R. Klaenhammer (1995). "Bacteriophage resistance in Lactococcus." Mol Biotechnol **4**(3): 297-314.

Dinsmore, P. K., D. J. O'Sullivan, et al. (1998). "A leucine repeat motif in AbiA is required for resistance of Lactococcus lactis to phages representing three species." Gene **212**(1): 5-11.

Duckworth, D. H. (1976). "Who discovered bacteriophage?" Bacteriol Rev **40**(4): 793-802.

Durmaz, E. and T. R. Klaenhammer (2000). "Genetic analysis of chromosomal regions of *Lactococcus lactis* acquired by recombinant lytic phages." Appl Environ Microbiol **66**(3): 895-903.

Filee, J., F. Tetart, et al. (2005). "Marine T4-type bacteriophages, a ubiquitous component of the dark matter of the biosphere." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(35): 12471-12476.

Forde, A. and G. F. Fitzgerald (1999). "Bacteriophage defence systems in lactic acid bacteria." Antonie Van Leeuwenhoek **76**(1-4): 89-113.

Garneau, J. E., D. M. Tremblay, et al. (2008). "Characterization of 1706, a virulent phage from *Lactococcus lactis* with similarities to prophages from other Firmicutes." Virology **373**(2): 298-309.

Gasson, M. J. (1983). "Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing." J Bacteriol **154**(1): 1-9.

Hassan, A. and J. F. Frank (2001). Starter cultures and their use. Applied Dairy Microbiology. E. H. Marth and J. L. Steele, CRC Press: 151-206.

Hejnowicz, M. S., M. Golebiewski, et al. (2009). "Analysis of the complete genome sequence of the lactococcal bacteriophage bIBB29." Int J Food Microbiol **131**(1): 52-61.

Huggins, A. (1984). "Progress in dairy starter culture technology." Food Technology **38**: 41-50.

Jarvis, A. (1987). "Sources of lactic *Streptococcus* phages in cheese plant." New Zeland J Dairy Science Technol **22**: 93-103.

Jarvis, A. (1989). "Bacteriophages of lactic acid bacteria." J Dairy Sci **72**: 3406-3428.

Jarvis, A. (1995). "Relationship by DNA homology between lactococcal phages 7-9, P335 and New Zeland industrial lactococcal phages." Int Dairy J **5**: 355-366.

Jarvis, A. W., G. F. Fitzgerald, et al. (1991). "Species and type phages of lactococcal bacteriophages." Intervirolgy **32**(1): 2-9.

Jarvis, A. W., M. W. Lubbers, et al. (1995). "Molecular biology of lactococcal bacteriophage c2." Dev Biol Stand **85**: 561-567.

Josephsen, A. and H. Neve (2004). Bacteriophage and Antiphage Mechanisms of Lactic Acid Bacteria. Lactic Acid Bacteria - Microbiological and Functional Aspects. S. Salminen, A. v. Wright and A. Owehand. New York, Marcel Dekker, Inc. **1**: 637.

Josephsen, J. and H. Neve (1998). Bacteriophages and lactic acid bacteria. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. S. Salminen, A. Von Wright and A. Owehand. New York, CRC Press: 385-436.

Josephsen, J., A. Petersen, et al. (1999). "Development of lytic *Lactococcus lactis* bacteriophages in a Cheddar cheese plant." International Journal of Food Microbiology **50**(3): 163-171.

Klaenhammer, T. R. (1991). "Development of Bacteriophage-Resistant Strains of Lactic-Acid Bacteria." Biochemical Society Transactions **19**(3): 675-681.

Labrie, S. J., J. Josephsen, et al. (2008). "Morphology, genome sequence, and structural proteome of type phage P335 from *Lactococcus lactis*." Appl Environ Microbiol **74**(15): 4636-4644.

Lodics, T. A. and L. R. Steenson (1993). "Phage-host interactions in commercial mixed-strain dairy starter cultures: practical significance - a review." J Dairy Sci **76**: 2380-2391.

Loof, M., J. Lembke, et al. (1983). "Characterization of the genome of the *Streptococcus lactis* "subsp. *diacetylactis*" bacteriophage P008 wide-spread in German cheese factories." Syst Appl Microbiol **4**: 11.

Madera, C., P. Garcia, et al. (2003). "Characterisation of technologically proficient wild *Lactococcus lactis* strains resistant to phage infection." Int J Food Microbiol **86**(3): 213-222.

Madera, C., C. Monjardin, et al. (2004). "Milk contamination and resistance to processing conditions determine the fate of *Lactococcus lactis* bacteriophages in dairies." Appl Environ Microbiol **70**(12): 7365-7371.

Mahony, J., H. Deveau, et al. (2006). "Sequence and comparative genomic analysis of lactococcal bacteriophages jj50, 712 and P008: evolutionary insights into the 936 phage species." FEMS Microbiol Lett **261**(2): 253-261.

Mc Grath, S., G. F. Fitzgerald, et al. (2004). Starter Cultures: Bacteriophage. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan and T. P. Guinee. **1**: 622.

Mc Grath, S., G. F. Fitzgerald, et al. (2007). "Bacteriophages in dairy products: pros and cons." Biotechnol J **2**(4): 450-455.

McGrath, S., G. F. Fitzgerald, et al. (2004). "The impact of bacteriophage genomics." Current Opinion in Biotechnology **15**(Food biotechnology): 6.

McGrath, S., D. van Sinderen, et al. (2002). "Bacteriophage-derived genetic tools for use in lactic acid bacteria." International Dairy Journal **12**(1): 3-15.

Moineau, S. (1999). "Applications of phage resistance in lactic acid bacteria." Antonie Van Leeuwenhoek **76**(1-4): 377-382.

Moineau, S. and C. Levesque (2005). Control of Bacteriophages in Industrial Fermentations. Bacteriophages: Biology and Applications. E. Kutter and A. Sulakvelidze, CRC Press. **1**: 286-296.

Moineau, S., S. Pandian, et al. (1994). "Evolution of a Lytic Bacteriophage via DNA Acquisition from the *Lactococcus lactis* Chromosome." Appl Environ Microbiol **60**(6): 1832-1841.

Moineau, S., D. Tremblay, et al. (2002). "Phages of Lactic Acid Bacteria: from Genomics to Industrial Applications." ASM News **68**: 6.

Neve, H., T. M. Cogan, et al. (1995). Bacteriophage. Dairy Starter Cultures. T. M. Cogan and J. P. Accolas. New York, Wiley-VHC. **1**: 157.

Nielsen, E. W., J. Josephsen, et al. (1987). "Lactic starters. Improvement of bacteriophage resistance and application of DNA technology." Danish J Agron - Selected research reviews(Special issue): 35-45.

Oliveira, M. R., W. V. Guimarães, et al. (1995). "Isolation and characterization of lactococcal bacteriophages from cheese whey." Rev Microbiol **26**: 171-182.

Pedulla, M. L., M. E. Ford, et al. (2003). "Origins of highly mosaic mycobacteriophage genomes." Cell **113**(2): 171-182.

Raiski, A. and N. Belyasova (2009). "Biodiversity of *Lactococcus lactis* bacteriophages in the Republic of Belarus." Int J Food Microbiol **130**(1): 1-5.

Rousseau, G. M. and S. Moineau (2009). "Evolution of *Lactococcus lactis* phages within a cheese factory." Appl Environ Microbiol **75**(16): 5336-5344.

Sambrook, J. F. and D. W. Russel (2001). Molecular cloning: A Laboratory Manual. Molecular cloning: A Laboratory Manual. J. F. Sambrook and D. W. Russel. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. **1, 2, 3**.

Sechaud, L., P. J. Cluzel, et al. (1988). "Bacteriophages of lactobacilli." Biochimie **70**(3): 401-410.

Shimizu-Kadota, M., T. Sakurai, et al. (1983). "Prophage Origin of a Virulent Phage Appearing on Fermentations of *Lactobacillus casei* S-1." Appl Environ Microbiol **45**(2): 669-674.

Suarez, V., S. Moineau, et al. (2008). "Argentinean *Lactococcus lactis* bacteriophages: genetic characterization and adsorption studies." Journal of Applied Microbiology **104**(2): 371-379.

Suttle, C. A. (2005). "Viruses in the sea." Nature **437**(7057): 356-361.

Teuber, M. and A. Geis (2006). The Genus *Lactococcus*. The Prokaryotes. S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, E. Stackebrandt and M. Dworkin, Springer. **4**: 205-228.

Teuber, M. and J. Lembke (1983). "The bacteriophages of lactic acid bacteria with emphasis on genetic aspects of group N lactic streptococci." Antonie Van Leeuwenhoek **49**(3): 283-295.

Venema, G., J. Kok, et al. (1999). "From DNA sequence to application: possibilities and complications." Antonie Van Leeuwenhoek **76**(1-4): 3-23.

Weinbauer, M. G. and F. Rassoulzadegan (2004). "Are viruses driving microbial diversification and diversity?" Environ Microbiol **6**(1): 1-11.

Whitehead, H. R. and G. A. Cox (1935). "The occurrence of bacteriophage in cultures of lactic streptococci." New Zealand J Dairy Science and Technol **16**: 319-320.