

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Microbiologia

António Manuel Sousa

Bacteriófagos: características gerais, utilidades e aplicações biotecnológicas

Belo Horizonte

2012

António Manuel Sousa

Bacteriófagos: características gerais, utilidades e aplicações biotecnológicas

Monografia apresentada ao Programa de pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Microbiologia - área de concentração: Microbiologia Industrial e Ambiental.

Orientadora Profa. Dra. Giliane de Souza Trindade

Belo Horizonte

2012

043

Sousa, António Manuel.

Bacteriófagos: características gerais, utilidades e aplicações biotecnológicas [manuscrito] / António Manuel Sousa. - 2012.

59 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Giliane de Souza Trindade.

Monografia apresentada ao Programa de pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de especialista em Microbiologia.

1. Microbiologia - Teses. 2. Bacteriófago - Teses. 3. Biorremediação - Teses. Fagoterapia. I. Trindade, Giliane de Souza. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576.858.9

António Manuel Sousa

Bacteriófagos: características gerais, utilidades e aplicações biotecnológicas

Monografia apresentada ao Programa de pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Microbiologia - área de concentração: Microbiologia Industrial e Ambiental.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2012.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Giliane de Souza Trindade (Orientadora)
Instituto de Ciências Biológicas – UFMG

Dra. Luciana Brandão
Instituto de Ciências Biológicas – UFMG

Dr. André Tavares da Silva Fernandes
Instituto de Ciências Biológicas – UFMG

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha filha (Rosária/Rosinha), meus irmãos (Alcinda/Cinda, Fátima/Fatiminha, José/Zé, Sousa, Vicente e João/Pinto†), tios, namorada, sobrinhos, primos e amigos.

À eles meus reconhecimentos pela esperança que depositam em mim e apoio moral na minha busca do saber entre todos os possíveis desafios longe da terra natal;

Ao meu pai Manuel† e a Minha Mãe Lurdes, espero que este trabalho seja motivo de orgulho dos pais que sempre incentivaram na formação desde os primeiros passos da vida. Agradeço o amor, apoio, incentivo, partilha e paciência.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a minha orientadora, Profa. Dra. Giliane de Souza Trindade que acreditou no meu potencial e propostas que resultaram neste trabalho. E a todos, meus agradecimentos pelo crédito que depositaram na minha capacidade para realização do presente trabalho com zelo e fé direcionada a um conhecimento científico de qualidade.

Ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas – ICB/UFMG, aos professores e assistentes, pela credibilidade, acolhimento, apoio e incentivo neste processo de busca do saber e conhecimento científico.

Aos professores e funcionários do ICB/UFMG pela afeição e estímulo ao aprendizado.

A todos os companheiros da especialização turma 2011 no ICB-UFMG.

A Fundação Universitária Mendes Pimentel/FUMP que proporcionou auxílio nas mensalidades para o custeio do curso.

Aos meus familiares, amigos que me deram e me dão muito apoio. À Gleice, minha namorada, e sua família que puderam me acolher e compartilhar todos os momentos difíceis que passei no Brasil.

A todos os colaboradores que de alguma forma (direta e/ou indiretamente) participaram na realização deste trabalho, a eles meus sinceros agradecimentos.

O Senhor é minha luz e minha salvação; de quem terei temor?

Salmos 27.1

Não há nada bom nem mau a não ser que estas duas coisas: a sabedoria que é um bem e a ignorância que é um mal.

Platão

RESUMO

SOUSA, Antonio Manuel. **Bacteriófagos: características gerais, utilidades e aplicações biotecnológicas** (Monografia de Especialização) Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte. 2012.

Os bacteriófagos ou fagos são vírus que infectam bactérias, consistindo, fundamentalmente, de material genético e proteínas. Os fagos são os vírus mais abundantes e ubíquos na terra. Com o advento da engenharia genética pode-se considerar os bacteriófagos como sendo ferramenta de grande importância no estabelecimento do equilíbrio ecológico. O objetivo principal, deste trabalho, foi identificar e descrever mecanismos de ação e importância dos bacteriófagos como ferramentas no processo de biorremediação. E para alcançar o objetivo, foi realizada uma pesquisa exploratória de bibliografia que se baseou no levantamento e seleção de informações relacionadas ao tema proposto neste projeto. A revisão da literatura foi feita de forma a selecionar artigos válidos para o tema proposto e capaz de induzir a resposta dos objetivos. A partir da revisão bibliográfica realizada, neste estudo, constatou-se que atualmente, na área do conhecimento sobre microbiologia, especificamente sobre os bacteriófagos, a biologia reconhece e utiliza esses micro-organismos, como ferramentas biológicas em várias áreas com foco no controle de alimentos, biofilme, meio ambiente e antibiótico para terapia humana. A literatura mostrou que os bacteriófagos são eficientes como controladores de micro-organismos patogênicos em alimentos, na redução de biofilmes e no controle microbiológico em água. Sendo assim, os fagos são ferramentas promissoras, mas novos estudos são necessários para melhor conhecimento dos mesmos no que diz respeito à manipulação e sobrevivência (replicação) em célula alvo, uma vez que os mecanismos de resistência bacteriana ainda são o ponto crucial para o insucesso da terapia para saúde humana com fago.

Palavras-chave: Bacteriófagos. Fagoterapia. Biorremediação.

ABSTRACT

Bacteriophages or phages are viruses that infect bacteria, consist mainly of genetic material and proteins. Phages are ubiquitous and most abundant on earth. With the advent of genetic engineering can be considered as bacteriophages revealed important tool in establishing the ecological balance. The main objective of this work was to Identify and describe mechanisms of action and importance of bacteriophages as tools for human therapy, treatment of wastewater and bioremediation. And to achieve the goal, it was exploratory research which was based on literature investigation and selection of information related to this proposed research project. The literature review was made in order to select valid items for the proposed issue and able to induce the response of the goals. From the literature review done in this study it was found that currently, in the knowledge of microbiology, specifically on the bacteriophage biology recognizes and uses these micro-organisms as biological tools in several areas focusing on control food biofilm environment and antibiotics for human therapy. The literature has shown that as bacteriophages are effective for controlling pathogenic microorganisms in foods, the reduction of biofilm and microbiological control in water. Therefore, in general, the phages are promising tools, but it should be more studies for a better understanding of the same with regard to handling and survival (replication) into the target cell, because the mechanisms of bacterial resistance still is the crux failure of therapy for human health with phage.

Keywords: Bacteriophage. Bioremediation. Fagotherapy

LISTA DE FIGURAS

Figura	1: Ilustração de um bacteriófago.....	14
Figura	2: Classificação dos bacteriófagos conforme ácidos nucleio e características morfológicas.....	22
Figura	3: Esquema de ciclo biológico de replicação de bacteriófagos.....	26
Figura	4: Esquema ilustrativo de rede de degradação microbiana de petróleo primário. ...	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação da família segundo ácido nucleico características e morfologia com base no ICTV	23
---	----

LISTA DE ABREVIATURA

BIREME	Biblioteca Regional de Medicina
BVS	Biblioteca Virtual em Saúde
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
DNA/ADN	Ácido desoxirribonucleico
ds	fitas duplas
EUA	Estados Unidos da América
EPA	Agência de Proteção Ambiental
HIV/VIH	Vírus de Imunodeficiência Humana
ICTV	<i>International Committee of Taxonomy of Viruses</i>
LPS	Lipopolissacarídeos
MedLine	Medical Literature Analysis and Retrieval System Online/Sistema Online de Busca e Análise de Literatura Médica.
mRNA	Ácido Ribonucléico tipo Mensageiro
PFU/UFP	Unidade Formadora de Placa
pH	Potencial Hidrogeniônico
PubMed	Publicações Médicas
RNA/ARN	Ácido Ribonucléico
SciELO	Scientific Electronic Library Online/Livraria Científica Eletrônica Online
ss	fitas simples
USDA	United States Department of Agriculture
UV	Radiação Ultra Violeta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivos Gerais	17
2.2	Objetivos Específicos	17
3	METODOLOGIAS	18
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
4.1	A descoberta e antecedentes sobre Bacteriófago	18
4.2	Características Gerais de Bacteriófagos	20
4.3	Classificação de bacteriófagos	21
4.4	Etapas de replicação /Ciclo biológico dos bacteriófagos	24
4.5	Estratégias de sobrevivência	27
4.5.1	Interação fago com célula hospedeira	28
4.6	Isolamento e quantificação de Bacteriófagos	30
4.7	Biodiversidade dos bacteriófagos	32
4.8	Fatores que interferem no ciclo de vida dos bacteriófagos	34
4.8.1	Fator físico: a temperatura	34
4.8.2	Fator físico e químico: pH e Salinidade (osmotolerância)	36
4.9	Utilidade e aplicação dos bacteriófagos	38
4.9.1	Fagoterapia	38
4.9.2	Indústria alimentar	41
4.9.3	Agropecuária	42
4.9.4	Saneamento e tratamento de água	43
4.9.5	Recuperação de áreas degradadas	45
5	DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1 INTRODUÇÃO

Os bacteriófagos ou fagos são vírus que infectam bactérias, consistindo fundamentalmente, de material genético e proteínas (VISPO & PUCHADES, 2001). Os fagos são mais abundantes e ubíquos na terra (SERGEI, 2008). Em número, quanto a sua presença na natureza, os bacteriófagos superam as bactérias e podem ser isolados do solo, da água, diretamente de animais e entre outros. (MANN, 2005; WEBER-DABROSKA *et al.*, 2000)

A estrutura dos fagos é determinada por proteínas de envelope (ou proteínas estruturais) cuja função principal é a de proteger o seu material genético (CLARK & MARCH, 2006; MATHUR *et al.*, 2003). Quanto à sua morfologia, exibem uma ampla variedade, dispostos de capsídeo viral, normalmente de formato icosaédrico, contendo o ácido nucleico, que pode ser DNA de fita simples ou de fita dupla ou, ainda, RNA; e uma estrutura em formato de cauda, que apresenta receptores que reconhecem sítios de ligação na bactéria hospedeira como se pode observar na figura 1. (FERREIRA *et al.*, 2008; VISPO & PUCHADES, 2001). A forma da disposição das proteínas dos fagos, geralmente em torno de material genético, define a variedade diferencial entre os fagos, de modo que existem fagos icosaédricos, helicoidais ou filamentosos (CLARK & MARCH, 2006). O mencionado material genético é protegido por uma capa de proteínas denominada cápside (VISPO e PUCHADES, 2001).

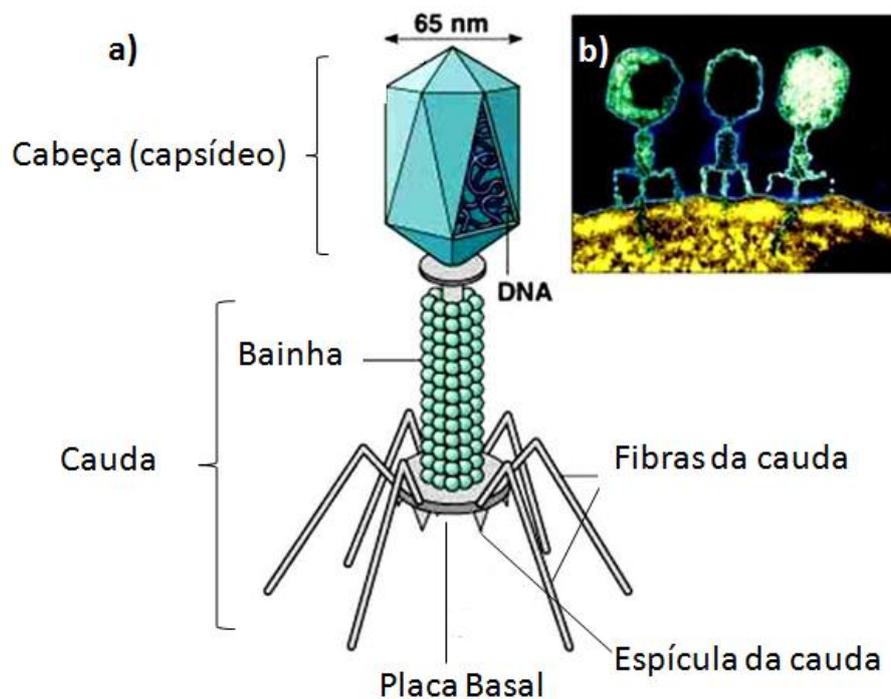


Figura 1: Ilustração de um bacteriófago.

Legenda: a) Esquema ilustrativo da estrutura de um fago T2 e T4, mostrando cauda e cabeça com, material genético em seu interior e b) Fotografia ao microscópio eletrônico de um bacteriófago.

Fonte: adaptado a partir de <http://fisioterapianomicromundo.blogspot.com/2010/09/classificacao-dos-virus.html>

Quanto à replicação dos fagos segue uma ordem primeiro se expressam os genes antes da síntese de cópias do material genético, posteriormente os genes intermediários que codificam as proteínas estruturais, e finalmente genes tardios, que se encarregam em sintetizar as lisinas que rompem a parede celular e liberam a progênie viral. Esse processo é contínuo, isto é, enquanto são sintetizadas as lisinas que rompem a parede celular simultaneamente são produzidas proteínas estruturais que se aderem ao fago, para que no momento da ruptura da célula sejam liberados os vírions, fragmentos de material genético, cápsídeos e proteínas estruturais não infecciosas (DULBECCO, 1996). Existem duas formas, conhecidas, do ciclo de multiplicação: a lítica e a lisogênica. Na forma lítica, característica dos bacteriófagos virulentos, a replicação viral ocorre no interior da célula bacteriana, causando lise e a consequente destruição da bactéria com a liberação de novas partículas virais (vírions) com potencial de ligação a novas células-alvo. Enquanto na forma lisogênica caracteriza os bacteriófagos, cujo material genético integra-se ao genoma da bactéria permanecendo num estado quiescente conhecido como profago. Esse material replica-se de forma concomitante à duplicação do genoma da bactéria hospedeira. (FERREIRA *et al.*, 2008)

Os bacteriófagos que desenvolvem o ciclo lítico são potenciais para uso do controle biológico de bactérias. Esses fagos ligam-se a receptores específicos da bactéria-alvo, que podem ser proteínas, peptidoglicanos, lipopolissacarídeos, cápsula ou flagelo. O material genético do bacteriófago é injetado no interior da bactéria, após a ligação, que nos fagos caudados ocorre por meio de contração da cauda. Segue-se então a replicação viral, pela qual o genoma do bacteriófago é transcrito pela RNA polimerase da bactéria hospedeira, gerando RNA mensageiro e redirecionando a maquinaria metabólica da bactéria para a formação de novas partículas virais, que se reúnem formando novos fagos, liberados após o rompimento da bactéria. (RAKHUBA *et al.*, 2010)

De acordo com Diaz (2004) e Reis *et al* (2004) o isolamento de fagos pode ser útil para biorremediação. E a tecnologia de isolamento proporciona a sua utilização de maneira complementar aos métodos já existentes para diminuição de bactérias patogênicas na biosfera. Uma estratégia empregada nos processos de biorremediação *in situ* é a combinação, em uma única estirpe bacteriana ou em um consórcio microbiano, de diferentes capacidades de degradação com outras características genéticas que tragam alguma vantagem seletiva em um ambiente determinado. Os métodos de alto rendimento de sequenciamento de DNA e de análise global da expressão gênica (genômica) e funcional (proteômica), junto com os avanços nos modelos *in silico* do metabolismo microbiano, proporcionam um enfoque global e racional para conhecer as enormes possibilidades, ainda inexploradas em grande parte, da utilização dos micro-organismos nos processos de biotecnologia ambiental que permitam o desenvolvimento sustentável.

A partir do desenvolvimento biotecnológico, os micro-organismos podem ser úteis para os seres vivos ou para o meio ambiente, pois com o desenvolvimento da ciência é possível conhecer e manipular esses micro-organismos sem correr qualquer risco, e uns dos exemplos disso é a utilização de bacteriófagos na biorremediação do solo, na fagoterapia, entre outras (DIAZ, 2004; EIS *et al.*, 2004).

Com o advento da engenharia genética pode-se considerar os bacteriófagos como ferramenta de grande importância no estabelecimento do equilíbrio ecológico (LÓPEZ, 2004). Segundo López (2004), os fagos, hospedeiros por excelência das bactérias, têm sido bastante estudados. Vale salientar que esses micro-organismos apresentam baixo nível de complexidade. No entanto, devido à pequena troca de informações genéticas, com seu hospedeiro, resulta em grande mudança na sua estrutura e funcionamento levando a variação do comportamento natural da célula hospedeira. Na interação dos fagos com bactérias hospedeiras ocorre a troca de informações genéticas entre cepas bacterianas e os bacteriófagos

que podem conter informações úteis para que a célula bacteriana evidencie certas funções que em outras condições não poderiam (LÓPEZ, 2004)

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

- Identificar e descrever mecanismos de ação e importância dos bacteriófagos como ferramentas para terapia humana, tratamento de água poluída e na biorremediação.

2.2 Objetivos Específicos

- Apresentar as características gerais dos fagos
- Descrever a ação dos fagos como ferramenta importante para terapia humana, na remediação de ambiente como o solo e água, e apresentar a importância da aplicação dos mesmos.
- Abordar métodos de isolamento dos bacteriófagos.

3 METODOLOGIAS

No presente trabalho foi realizada a pesquisa exploratória de bibliografia que consistiu no levantamento e seleção de informações relacionadas ao projeto de pesquisa em questão. A revisão da literatura foi feita de forma criteriosa, a fim de selecionar artigos válidos para o tema proposto, e capaz de induzir às respostas dos objetivos acima apresentados.

O acesso à bibliografia foi feito da seguinte forma: manualmente (pesquisa direta nos acervos de referências disponíveis nas bibliotecas de rede nacional e internacional) e/ou eletronicamente (uso de sistema de base de informações disponíveis na internet, através de sites e periódicos online de rede nacional - Periódico CAPES, e internacional - SciELO, Google Acadêmico; MedLin/PubMed e BIREME/BVS).

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 A descoberta e antecedentes sobre Bacteriófago

A existência primordial dos bacteriófagos tem como referência os relatos do bacteriologista britânico Ernest Hankin em 1896. Hankin observou que as águas dos rios Jumna e Gange, da Índia, podiam inativar o agente do cólera e, dessa forma, Hankin acreditava que havia nestas águas havia uma elevada atividade antibacteriana que acometia o *Vibrio cholerae*. No entanto, não se conhecia ao certo o que seria responsável pela ação. Dois anos depois o bacteriologista russo Gamaleya observou um fenômeno similar enquanto trabalhava com *Bacillus subtilis*. Duas décadas se passaram e através das pesquisas de Frederick W. Twort, um bacteriologista da Inglaterra e superintendente do Instituto Brown de Londres, caracterizou o fenômeno relacionando-o com ação dos bacteriófagos sobre seus conhecidos hospedeiros as bactérias (SULAKVELIDZE *et al*, 2001). Segundo Sulakvelidze *et al*. (2001) ainda que este efeito possa ter sido causado por uma combinação de agentes, atualmente parece evidente que a presença de bacteriófagos nessas águas tenha tido papel fundamental para tal observação.

Os relatos de Hankin e seus seguidores levantaram várias hipóteses que foram testadas e confirmadas pelo britânico Frederick W. Twort por volta de ano de 1915. Para isso ele

inoculou uma placa de ágar nutritivo com o vírus da varicela na esperança de encontrar um modo de replicação deste agente e notou que algumas colônias bacterianas tinham sofrido uma mudança visível e apresentavam um aspecto aquoso e mais transparente. Hankin notou também que as colônias tinham perdido a capacidade de crescer e conseqüentemente lisavam. A partir deste passo começou-se a demonstrar que a infecção de células em bom estado com a solução transparente das bactérias lisadas promovia a lise das células saudáveis. Esta solução podia ser diluída mil vezes, no entanto, sempre que colocada em soluções com bactérias intactas promovia o mesmo fenômeno de lise bacteriana. O agente podia ser guardado durante seis meses, mas quando aquecido perdia a sua atividade de lise. Com isso, Twort publicou um artigo sobre este tema em 1915 sugerindo que a explicação para a sua experiência era a descoberta de um vírus capaz de lisar células bacterianas (LEVINE, 1992). No entanto, dois anos mais tarde é que a existência dos fagos foi confirmada por Félix d'Hérelle, um microbiologista do Instituto Pasteur de Paris. Embora as observações de Hankin e Twort tenham sido fundamentais, Félix d'Hérelle foi considerado o descobridor dos bacteriófagos.

A descoberta de D'Hérelle associa-se ao surto de disenteria hemorrágica entre as tropas francesas estacionadas nos limites da cidade de Paris, em Maisons-Laffitte, em Julho-Agosto de 1915. Mas, antes, segundo Sulakvelidze *et al.* (2001), D'Hérelle, por volta de 1910, já tinha observado um fenômeno idêntico quando estudava meios microbiológicos para controlar a praga de gafanhotos no México. D'Hérelle detectou que a doença entre as tropas francesas era causada por um *Bacillus* detectado em emulsões de fezes provenientes de pessoas doentes. D'Hérelle espalhou esta bactéria em placas de petri contendo ágar para permitir a multiplicação e posteriormente isolá-las. D'Hérelle observou que enquanto as bactérias cresciam e cobriam a superfície da placa de petri, também apareciam pequenas manchas circulares onde não havia crescimento que denominou-as de *taches vierges* (placas). Na seqüência, a sua pesquisa iniciou o isolamento da bactéria e das placas a partir da amostra de cada paciente com intuito de relacionar as mudanças na doença com as mudanças observadas nas placas. Repetiu este procedimento em três dias e obteve em todas as culturas, apenas crescimento bacteriano e nenhum sinal de *taches vierges*. Entretanto, no quarto dia, algumas horas após a colocação de gotas de amostra numa cultura de *Bacillus* de disenteria, a cultura estava completamente límpida percebendo também, melhoria no paciente (LEVINE, 1939). A partir destes resultados, D'Hérelle, atribuiu o fenômeno a ação à um grupo de vírus que veio a denominá-los de bacteriófagos, nome que sugere “vírus que comem as bactérias” (SULAKVELIDZE *et al.*, 2001). Antes das observações de D'Hérelle, havia dúvidas se o fenômeno seria mesmo causado por um vírus, sendo que muitos acreditavam ser devido à

presença de um “fermento”, elemento que hoje é conhecido por enzimas (ACKERMANN, 1998).

4.2 Características Gerais de Bacteriófagos

Os bacteriófagos são vírus que se multiplicam, principalmente, em Archea e bactérias, sendo de natureza geral similar aos demais vírus (ACKERMANN, 2003; GREGORACCI *et al.*, 2006). Basicamente são constituídos de ácido nucleico envolto por uma capa proteica (capsídeo), podendo ou não estar envolto por envelope lipoproteico. Esses micro-organismos possuem morfologia diversa, frequentemente apresentam em forma icosaédrica com cauda, ou ainda apresentam-se morfologia filamentosa. Podem ter RNA, ssDNA (de fita simples) e dsDNA (de fita dupla) como material genético. Um modelo clássico de bacteriófago é o fago Lambda que infecta *Escherichia coli* que apresenta uma cabeça icosaédrica e cauda contrátil separada por um colar e fibras que se fixam ao receptor da membrana bacteriana, usualmente ao lipopolissacarídeo (LPS) ou pili. Com essa fibra, o bacteriófago injeta seu material genético no interior da célula bacteriana. Subsequentemente, outras etapas do ciclo de replicação desses vírus têm início e podem culminar com a lise da bactéria ou os fagos podem permanecer na lisogenia (LEVINE, 1992). Segundo esse autor, no caso dos fagos líticos, há expressão precoce de genes que proporcionam a síntese de enzimas necessárias à duplicação de seu material genético e em seguida a formação de proteínas para a composição de novas partículas virais. No final ocorre a síntese de peptídeos que formam poros e causam o rompimento das estruturas de membrana da bactéria que possibilita a liberação de inúmeras cópias do bacteriófago no meio extracelular. Já na lisogenia, o bacteriófago injeta seu material genético na célula, porém este é incorporado ao genoma da bactéria em locais específicos. O DNA inserido, chamado pró-fago, sintetiza um peptídeo repressor que evita a síntese de enzimas necessárias para a replicação do material genético e síntese de proteínas do capsídeo, ficando sua duplicação dependente da replicação do genoma do hospedeiro. Quando em estresse, por exemplo, por irradiação UV, o repressor deixa de atuar e o DNA do bacteriófago é então duplicado, as proteínas sintetizadas, as partículas formadas e a célula do hospedeiro finalmente é lisada para a liberação do bacteriófago no ambiente. Para Levine (1992), os bacteriófagos parecem ter preferência à lisogenia para hospedeiros específicos. No entanto, os fagos líticos não têm preferência específica de bactérias, e são capazes de infectar várias

espécies diferentes. Alguns fagos apresentam características de alta virulência, produção de grande quantidade de vírions que desviam vias metabólicas do hospedeiro para a replicação viral.

Já foram descritos vários bacteriófagos que, provavelmente, exercem papel preponderante na ecologia de micro-organismos e na transferência de genes entre espécies (JENSEN *et al.*, 1998). Segundo Ackermann, (2003) e Gregoracci *et al.* (2006), já foram descritos mais de cinco mil (5000) fagos, mas apenas cerca de 300 fagos foram largamente caracterizados, dos quais se deriva a maior parte do conhecimento atual.

4.3 Classificação de bacteriófagos

Os grupos dos bacteriófagos compreendem várias espécies de vírus que apresentam diferentes morfologias e tamanho. Conforme Ackermann (2003), Gregoracci *et al.* (2006) os bacteriófagos são constituídos de genomas RNA ou de DNA, fitas simples ou dupla, linear ou circular, segmentado ou único, sendo que nem todas as combinações possíveis estão presentes (Figura 2). São classificados em famílias, em relação a sua morfologia e tamanho. Cerca de 96% desses vírus apresentam uma estrutura caudal, mas existem os filamentosos e pleomórficos (Ackermann 2007; Hendrix 2002). Segundo Ackermann (2003), geralmente, o fago, na fase de vírion, é composto por dois componentes básicos: ácido nucleico e um capsídeo de proteínas e alguns apresentam lipídeos como componentes do envelope ou de uma parede, a parte, composta de lipídeos.

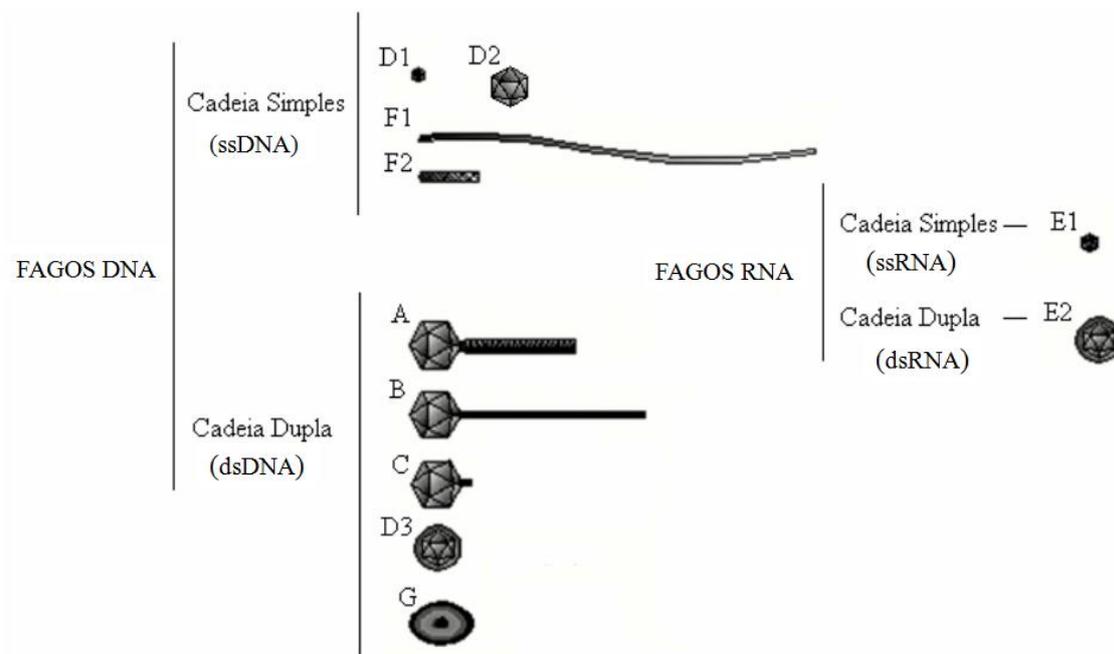


Figura 2: Classificação dos bacteriófagos conforme ácidos nucleicos e características morfológicas.

Legenda: ss- fita simples; ds- fita dupla; A - fagos com cauda contrátil; B - fago com cauda não contrátil; C - fago de cauda curta; D1 e D2- fagos icosaédricos; D3- fagos espiral; E1- fagos icosaédricos; E2- fagos espiral; F1 e F2 fagos filamentosos; G- fagos pleomórficos.

Fonte: Ackermann e Gershman. (1992)

O grupo dos fagos exibe uma diversidade de formas, tamanhos, simetrias do capsídeo. A classificação dos fagos segue os critérios do Comitê Internacional para Taxonomia de Vírus (ICTV¹). Conforme a figura 2 os fagos são agrupados em seis categorias conforme o tipo morfológico, tipo de ácido nucleico e hospedeiro (ACKERMANN e GERSHMAN, 1992). Conforme os autores, quanto ao tipo de ácido nucleico podem ser tanto de DNA de cadeia simples (ss) ou de cadeia dupla (ds) ou de RNA de cadeia simples (ss) ou de cadeia dupla (ds). Os fagos de DNA de cadeia dupla podem ser: fagos com cauda contrátil (A), com cauda não-contrátil (B), com cauda curta (C), fagos sem cauda (D3) e fagos pleomórficos protegidos por um invólucro lipídico (G). Os fagos de genoma DNA de cadeia simples são bastante diferentes podendo ser icosaédricos (D1 e D2) ou filamentosos (F1 e F2). Os fagos do grupo E são icosaédricos com RNA de cadeia simples (E1) ou dupla (E2) (ACKERMANN e GERSHMAN, 1992).

Como mencionado anteriormente, a maioria dos fagos estudados pertencem à categoria dos que possuem cauda longa e não contrátil e se dividem em três famílias. Cerca de 60% dos fagos com cauda longa e não contrátil pertencem aos *Siphoviridae*, 25% dos fagos

¹ Sigla em Inglês que quer dizer International Committee of Taxonomy of Viruses

com cauda contráctil são *Myoviridae* e os de cauda curta e não contráctil são *Podoviridae*. (ACKERMANN & GERSHMAN, 1992). De acordo com o ICTV os fagos são classificados em ordem gênero e família. Com base nessa instância faz-se a análise morfológica e propriedades como, tipo de ácido nucleico e organismo hospedeiro (Tabela.1).

Tabela 1: Classificação da família segundo ácido nucléico características e morfologia com base no ICTV

Família	Ácido nucleico	Características	Morfologia
<i>Myoviridae</i>	Linear dsDNA	Não envelopado, cauda contráctil	
<i>Siphoviridae</i>	Linear dsDNA	Não envelopado, cauda longa não contráctil	
<i>Podoviridae</i>	Linear dsDNA	Não envelopado, Cauda curta não contráctil	
<i>Corticoviridae</i>	Circular dsDNA	Não envelopado, icosaédrica	
<i>Tectiviridae</i>	Linear dsDNA	Não envelopado, icosaédrica	
<i>Lipothrixviridae</i>	Linear dsDNA	Envelopado, em forma de haste	
<i>Plasmaviridae</i>	Circular dsDNA	Envelopado, pleomórfica	
<i>Rudiviridae</i>	Linear dsDNA	Não envelopado, em forma de haste	
<i>Fuselloviridae</i>	Circular dsDNA	Não envelopado, em forma de limão	
<i>Inoviridae</i>	Circular ssDNA	Não envelopado, filamentososo	
<i>Microviridae</i>	Circular ssDNA	Não envelopado, icosaédrica	
<i>Leviviridae</i>	Linear ssDNA	Não envelopado, icosaédrica	
<i>Cystoviridae</i>	Segmented dsRNA	Envelopado, espiral	

Fonte: adaptado baseado no ICTV (<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>) e Ackermann e Gershman (1992)

Quanto à classificação dos fagos, outras propriedades são consideradas e regularmente atualizadas pelo ICTV, tais como: propriedades, químicas e físicas da partícula - massa molecular, coeficiente de sedimentação, estabilidade (por exemplo, o pH, temperatura, solventes, detergentes, entre outras), tamanho do genoma (kb/kbp), ácido nucleico (simples ou cadeia dupla), genoma linear ou circular, número e tamanho de segmentos, entre outras; quanto às proteínas - considera-se o número-quantidade, tamanho, atividade funcional das proteínas estruturais e não-estruturais; quanto aos lipídios - considera-se o conteúdo, características, entre outras; quanto às propriedades biológicas – considera-se hospedeiro, modo de transmissão no ambiente, distribuição geográfica, patogenicidade, entre outras e quanto à morfologia (considera-se tamanho, forma, presença ou ausência de envelope, simetria do capsídeo, estrutura (ACKERMANN e GERSHMAN, 1992).

O sistema taxonômico ICTV requer sempre a visualização da morfologia viral por microscopias de alta resolução, no entanto, essa técnica não permite a identificação da natureza e estrutura dos genoma dos fagos. Recentemente a nova estratégia para classificação

de fagos tornou-se popular e se baseia em informações de sequências dos genomas de fagos. Análise filogenética construídas com sequências de proteínas preditas a partir do sequenciamento dos genomas de vários fagos sequenciados estabelece as relações genéticas entre as espécies descritas (GOODE *et al.*, 2003). Todas as sequências proteicas preditas, presente nos genomas, são extremamente úteis para o agrupamento de fagos, de forma independente, caso a origem de proteína viesse a partir de um ancestral comum ou através de transferência lateral. As proteínas, que são conservadas em todos os membros de um grupo específico podem ser consideradas como marcadores genéticos para os seus respectivos grupos e, portanto, podem ser usadas para classificar numerosos representantes desconhecidos no ambiente e permitir a sua distribuição entre grupos distintos da árvore filogenética. No entanto segundo Goode *et al.*, (2003), foram descobertos algumas discrepâncias entre as duas estratégias de classificação baseados nas análises genéticas ou na estrutura dos genomas e a classificação taxonômica morfológica pela ICTV. Por exemplo, fago ϕ P22 *S. typhimurium*, *Podoviridae* de acordo com os padrões ICTV, revelou semelhança, ao nível genômico, com os *Siphophage* como fagos λ .

4.4 Etapas de replicação /Ciclo biológico dos bacteriófagos

Os fagos, assim como todos os outros vírus, são parasitas intracelulares obrigatórios e, assim, para se replicarem requerem um hospedeiro específico. Os fagos não têm metabolismo próprio e, por esse motivo, necessitam do metabolismo, dos recursos energéticos e dos recursos materiais dos seus hospedeiros para se replicarem. Vários passos de um processo de replicação de fagos são comuns a todos os vírus (WELKOS *et al.*, 1974; DUCKWORTH, 1987). Para esses autores, o contato dos fagos com bactéria hospedeira ocorre por meio de suas caudas que reconhecem os pontos específicos de receptores. Para isso, segundo esses autores, é necessário que a superfície dos hospedeiros se apresente com carboidratos, proteínas e moléculas de lipopolissacaríde e flagelos. A maioria dos fagos é bastante específica quanto aos receptores. A interação com hospedeiro acontece somente quando há o mínimo de semelhanças nas suas estruturas desejáveis. Esta especificidade serve como base para os métodos de fagotipagem que são amplamente utilizados para a identificação de espécies ou subespécies bacterianas.

A replicação dos fagos consiste, de maneira geral, em cinco etapas, a saber: a

adsorção; separação do ácido nucleico do envoltório proteico; expressão e replicação do ácido nucleico; formação de novas partículas fágicas e a liberação de novos fagos (COMEAU & KRISCH, 2005; GREGORACCI *et al.*, 2006).

A adsorção compreende a etapa inicial de replicação dos fagos e é um processo que não se difere dos demais vírus (LINDBERG, 1973; WEIMBAUER, 2004; COMEAU & KRISCH, 2005; GREGORACCI *et al.*, 2006). Conforme a literatura, essa etapa, no ciclo de multiplicação dos fagos acontece de duas formas distintas: a forma reversível e a irreversível. Na primeira interação caracterizada como reversível, a interação atrativa é bastante forte que vem a se estabilizar a partir da segunda interação onde as enzimas hidrolíticas começam a atuar com propósito de facilitar a entrada de material genético através da parede do hospedeiro. Quase todas as estruturas da parede celular do hospedeiro e estruturas acessórias como o pili, o flagelo e cápsula podem ser úteis para o fago durante a adsorção.

A separação do ácido nucleico da proteína ocorre após a ligação irreversível do fago à superfície parcial ou total da célula. Nesta etapa ocorre a liberação do material genômico do fago no interior da bactéria. Além disso, ocorre a modificação da membrana celular da bactéria de forma a tornar a célula permissiva de invasão pelo DNA fágico, através da introdução de novas proteínas na membrana celular que ocorre em quatro formas distintas. O DNA pode penetrar na célula através da injeção do ácido nucleico da endocitose, ou da fusão do envelope fágico com a membrana celular do hospedeiro e translocação. Os fagos que penetram por endocitose, após a sua ligação ao receptor, são englobados pela membrana plasmática, ficando no interior de vesículas nas células. (ZOON *et al.*, 1976).

Na sequência da adsorção e a injeção de ácido nucleico no hospedeiro, em reação da interação fago-bactéria, ocorrem fenômenos resultante que são classificados em: resposta *lítica* - o fago redireciona o metabolismo do hospedeiro para a produção de novos fagos que são liberados através da lise da célula, e a resposta *lisogênica* que consiste na criação de DNA fágico a partir do cromossoma do hospedeiro. Nestes casos, o fago replica-se sem causar a lise das células (figura 3) (KORNBERG, 1980).

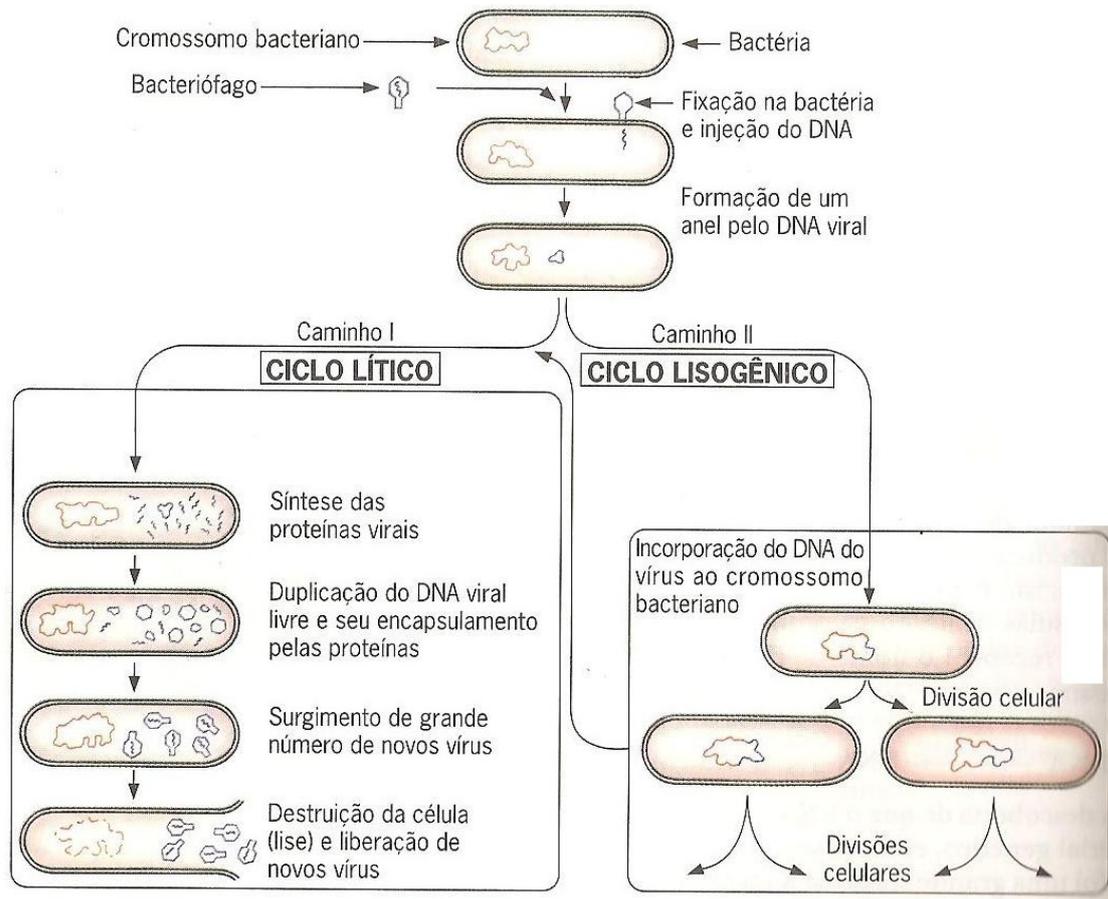


Figura 3: Esquema de ciclo biológico de replicação de bacteriófagos.

Fonte: disponível em <http://juliasarabioifes.wordpress.com/2011/02/15/13/> acessado em 18/02/2012

A formação de novas partículas fágicas envolve inúmeros processos bioquímicos que ocorrem em células infectadas e que são controlados e têm uma progressão ordenada. As fases do processo são geralmente referidas como pré-iniciais, iniciais e tardias ou finais (KORNBERG, 1980). Segundo esses autores, nas reações da fase *pré-inicial* o fago apodera-se da maquinaria de síntese proteica da célula hospedeira e prepara a célula para a produção de macromoléculas. Outras funções pré-iniciais asseguram que apenas o ácido nucleico do fago é replicado e que nenhum outro fago estranho interfira no processo (ACKERMANN, 1999 & LEVINE, 1939). De acordo com Ackermann (1999), um dos aspectos da replicação fágica mais fascinante e menos compreendida é o fato de uma pequena porção de ácido nucleico, após a entrada na célula, conseguir ser responsável pela subversão completa de toda a capacidade sintética da célula para a síntese de novos fagos. Na fase inicial ocorre a síntese de enzimas e substratos necessários para a posterior replicação do ácido nucleico. Na fase final ou tardia são sintetizadas as proteínas estruturais virais e enzimas necessárias para a morfogênese do capsídeo e, também, para o empacotamento do ácido nucleico. A progressão

ordenada das reações durante a infecção fágica resulta da expressão gênica sequencial do fago. Depois da síntese das proteínas e do ácido nucleico é necessário que ocorra a junção dos dois para se formarem partículas virais maduras (ACKERMANN, 1999 e LEVINE, 1939).

A liberação de novos fagos é um processo realizado através de um sistema de lise dupla em que: o peptidoglicano tem de ser hidrolisado através de endolisinas que atacam a porção da parede celular; a membrana citoplasmática tem de ser destruída pelas holinas (ACKERMANN, 1999). Uma lise celular natural pode ter consequências letais para os vírus. Quando ocorre lise prematura da célula bacteriana o fago pode ainda não estar completamente formado e, por conseguinte, pode ocorrer a perda da futura progênie (LEVINE, 1939). Para um grupo específico de fagos como os fagos com cauda, a morfogênese é tão idêntica que foi sugerida um processo padrão (ACKERMANN, 1999).

4.5 Estratégias de sobrevivência

Segundo Kruger e Bickle (1983), no ciclo natural da vida de todos os micro-organismos os bacteriófagos destacam-se como os principais predadores de bactérias. As bactérias evoluíram em relação à formação de meios de proteção contra o ataque viral em quase todas as fases do ciclo de vida do fago. A defesa mais eficaz consiste em evitar qualquer contato entre o fago produtivo e as bactérias.

Provavelmente as células bacterianas evoluíram quanto aos mecanismos de restrição de sistema de modificação de DNA e, principalmente, no aumento da estabilidade genética a partir da introdução de um material genético estranho em suas células. Esta função é importante o suficiente para promover uma evolução em várias ocasiões, como atestam as várias classes de diferentes enzimas de restrição que existem atualmente. Mas os bacteriófagos desenvolveram mecanismos de antirrestrição. Alguns dos mecanismos podem desempenhar papéis adicionais no ciclo de vida viral. (KRUGER & BICKLE 1983). Segundo os autores, a antirrestrição desperta interesse em muitos aspectos da biologia molecular.

Segundo Jonczyk (2011), os bacteriófagos podem ser resistentes a fatores físicos, químicos, como a temperaturas extremas (baixas e altas temperaturas), pH, salinidade e concentração de íons. De acordo com alguns pesquisadores, os fagos são altamente diversificados e podem se diferir não somente entre as famílias, mas também dentro das famílias. Sabe-se que a variação de um fator que influencia a sensibilidade pode variar de um

fago para o outro (THORNE & HOLT, 1974; MÜLLER-MERBACH *et al.*, 2004). Pode-se esperar que o crescente interesse das indústrias farmacêuticas e agrícolas em fagos resulte em novos dados sobre a sobrevivência desses vírus e métodos de sua preservação.

Em um estudo realizado por Ackermann *et al.* (2004), os autores mostraram que fagos com cauda foram os mais estáveis em condições adversas, mas não houve diferença significativa de sensibilidade entre fagos com cauda contrátil, não contrátil, ou curto. Apesar de alguns fagos que apresentam capsídeo grande com diâmetro de 100 nm sobreviverem melhor do que fagos com cabeça menor com diâmetro de 60 nm. Os autores observaram que o fago cúbico PRD1 e AP50 pertencentes à família *Tectiviridae* apresentaram sensibilidades em diferentes condições no que diz respeito ao armazenamento e estocagem. Os fagos PRD1 sobreviveram melhor quando armazenados a -80 °C, mas AP50 perde a sua atividade depois de seis meses na mesma temperatura.

4.5.1 Interação fago com célula hospedeira

A interação dos fagos com seus hospedeiros (bactérias) possui um caráter invasivo e de predação. As bactérias em seu ambiente natural são, constantemente, confrontadas com os bacteriófagos. Em resposta à ação dos fagos, as bactérias têm desenvolvido meios de proteção em defesa contra seus invasores em quase todas as fases do ciclo de vida. A defesa mais eficaz é a de evitar qualquer contacto entre o fago e as bactérias (KRUGER & BICKLE, 1983). Para os autores, isto acontece através da mutação dos receptores de fagos na parede celular das bactérias ou através da secreção com função de barreira impedindo a abordagem do fago. Esta barreira consiste na formação de camada, na parede celular, com enzimas de restrição ou camada mucosa com propriedade antiaderente que impede a adsorção dos fagos (acontece na fase inicial da infecção viral na bactéria). Mas os fagos têm encontrado mecanismos de superação das barreiras imposta pelas bactérias que consiste em adaptação às células do hospedeiro a partir das modificações resultantes da interação do fago e hospedeiros. Dependendo da célula que tenha servido de hospedeiro, o vírus carrega uma variante específica de modo que a capacidade de se replicar em células da mesma linhagem melhore. Mas a capacidade de se replicar em células de uma estirpe diferente é restrita (KRUGER & BICKLE, 1983)

O mecanismo “clássico” de restrição de bacteriófagos consiste na clivagem

endonucleolítica (restrição) de DNA do fago quando não é especificamente metilado (modificados) em determinados locais (BICKLE, 1982; BOYER, 1971; ENDLKCH & LINN, 1981; MCCLELLAND, 1981; MODRLCH, 1982; MODRKCH & ROBERTS, 1982; ROBERTS, 1982; SINGLETON *et al.*, 1981; YUAN, 1981).

Após completar-se o ciclo de crescimento dos fagos num hospedeiro, o DNA viral é metilado nos locais de reconhecimento específico para adaptar-se ao sistema específico do DNA do hospedeiro e tornam-se, desta forma, hábeis para infectar outros hospedeiros que possuem o mesmo DNA de sistema de restrição-modificação. A modificação de DNA controlado do hospedeiro é a principal forma de superar a restrição de DNA. No entanto, quando um fago infecta uma célula com um DNA de diferente sistema de restrição de modificação, o DNA do fago é restrito/restringido porque não é metilado nas sequências de DNA reconhecidas pelo novo sistema. A restrição e os processos de modificação afetam não só o DNA do fago, mas também, como regra, afeta o DNA da bactéria (ENDLKCH & LINN, 1981; MCCLELLAND, 1981; MODRLCH, 1982; MODRKCH & ROBERTS, 1982; ROBERTS, 1982; SINGLETON *et al.*, 1981; YUAN, 1981).

Enquanto isso, como se sabe, a restrição fenotípica e modificação de fagos também podem ocorrer por um mecanismo que envolve a modificação de proteínas, em vez de reações no nível do DNA. Desta forma, a capacidade de um fago adsorver numa nova célula hospedeira é influenciada pela modificação do fago que lhe é conferida pela célula hospedeira anterior. A maioria das espécies e cepas de bactérias contém endonucleases que conferem propriedades esperadas de enzimas de restrição, isto é, dão sequência específica de clivagem de DNA, indicando a importância de restrição para as bactérias (KRUGER & BICKLE, 1983). O envolvimento da maioria destas enzimas em um sistema de restrição e de modificação não tem sido demonstrado (para a maioria, nem sequer foi examinada). Algumas delas podem ter outras funções, como na recombinação ou reparação de caminhos do processo de infecção dos fagos. Com isto os bacteriófagos adaptam-se aos sistemas de restrição de seus hospedeiros, desenvolvendo uma gama de mecanismos para evitar os piores efeitos da restrição. Mecanismos antirrestrição de uma forma ou de outra têm sido encontrados em praticamente todos os fagos que foram examinados como, por exemplo, mecanismos que são utilizados pelos bacteriófagos de *B. subtilis* e *E. coli* (KRUGER e BICKLE, 1983; SINGLETON *et al.*, 1981; YUAN, 1981).

Três grandes grupos de restrição e modificação de sistemas são diferentes um dos outros quanto à complexidade das estruturas, mecanismos de reação enzimática e quanto aos tipos de sequências de DNA que são reconhecidas. A grande maioria das enzimas, conhecidas,

é do tipo II. Isso ocorre porque essas são as enzimas simples que reconhecem geralmente sequências simétricas e que cortam o DNA em uma posição fixa em relação à sua sequência de reconhecimento (MODRLCH, 1982; MODRKCH & ROBERTS, 1982; WELLS *et al.*, 1981). Segundo esses autores, essas enzimas são as que revolucionaram a biologia durante a última década pelo fato deles abrirem possibilidades para a clonagem de genes e análise de DNA. Em consequência disso, muitos gêneros e espécies de bactérias têm sido sistematicamente avaliados quanto a sua presença. Estes procedimentos de triagem são relativamente fáceis. E as enzimas dão boa definição das características de fragmentos de DNA que pode ser reconhecido em agarose ou em gel de poliacrilamida. (MODRLCH, 1982; MODRKCH & ROBERTS, 1982; WELLS *et al.*, 1981). Segundo esses autores, dependendo das enzimas e da diversidade delas para a restrição, pode-se considerar ser improvável que um bacteriófago possa desenvolver mecanismos igualmente eficazes para combater todas as enzimas que podem ser encontradas em seus hospedeiros. Além disso, muitas cepas de bactérias produzem mais de uma enzima. E os tipos de enzimas produzidas, nessas cepas de bactérias, podem mudar com o tempo, assim como alguns sistemas são perdidos por mutação e os novos são adquiridos através de processos como a conjugação ou transdução.

O gene do fago responsável pela antirrestrição tem sido chamado de 0.3 (STUDIER, 1975; STUDIER & MOVVA, 1976). Esse gene é denominado a partir de sua posição no mapa genético (0,3 gene é a posição mais próxima da extremidade esquerda do DNA no mapa do gene viral). Segundo estes autores a capacidade de superar a restrição se associa à descoberta de OCR que significa “superar a restrição clássica” (KRIGER & SCHROEDER, 1981 e KRIGER *et al.*, 1977). Neste contexto, vale salientar que esses genes são expressos não só após a indução da profago, mas também durante a infecção lítica para que o DNA, e as partículas fágicas produzidas sejam modificadas (JENTSCH *et al.* 1981; NOYER-WEIDNER *et al.*, 1981; TRAUTNER *et al.*, 1980). Uma vez que as enzimas de restrição reconhecem a sequência, são perceptíveis em várias cepas de *B. subtilis* e outras espécies de *Bacillus*. (NIKOLSKAYA *et al.*, 1979).

4.6 Isolamento e quantificação de Bacteriófagos

Desde o descobrimento dos fagos, em 1915, os avanços realizados para compreender o modo de replicação e a biologia molecular desses vírus têm sido notáveis. Inúmeros métodos

de recuperação de fagos têm surgido através do seu isolamento, purificação e concentração (LEVINE, 1939). Segundo Levine (1939), os fatores fundamentais para a escolha de um método recaem, basicamente, na eficiência bem como nos custos associados, na rapidez e na facilidade de execução do método. Para o autor, o processo de isolamento dos fagos é rápido, simples e barato.

Postula-se que onde há bactérias é possível encontrar pelo menos um fago para cada hospedeiro diferente. Solo, água, esgoto, os seres humanos e os animais (pele, cavidade oral, saliva, fezes, intestino) e até mesmo o alimento de consumo humano são alguns exemplos de onde os fagos podem ser isolados. Os fagos têm evoluído a ponto de sobreviverem em ambientes agressivos como temperaturas extremas (MARKS & SHARP, 2000; ASHELFORD *et al.*, 2003; NEVE *et al.*, 1994; MERRIL 1974).

O isolamento dos bacteriófagos pode ser feito a partir de esgotos de origem humana, animal e industrial. O esgoto doméstico é bastante rico quanto à presença de vários hospedeiros potenciais dos vírus e apresenta a predominância de enterobactérias que são potenciais hospedeiros. Acredita-se que o esgoto doméstico seja rico em diversidade viral e existe, atualmente, uma necessidade de se realizar mais estudos sobre a ecologia dos vírus nesse ambiente (WHITHEY *et al.*, 2005).

Existem vários métodos para quantificar fagos que podem ser distinguidos entre métodos diretos pela contagem total de fagos com auxílio da microscopia eletrônica e métodos indiretos através da dosagem de unidade formadora de placa (WHITHEY *et al.*, 2005). Segundo esses autores, as contagens indiretas são obtidas através da contagem das UFP ou halos numa placa de petri com uma camada de células hospedeiras. As contagens dos UFP representam apenas uma fração dos fagos totais existentes. Quando se realizam contagens diretas, o número de fagos é normalmente 100 a 1000 vezes superior. Este tipo de contagem pode ser realizada utilizando diferentes técnicas, tais como: microscopia eletrônica (ME), microscopia de epifluorescência (MEP) e citometria de fluxo (CF). Para a contagem por MEP e CF é necessário a coloração dos fagos com fluorocromos adequados (como por exemplo, DAPI, SYBR Green I, Gold SYBR, entre outros). Estes métodos de contagem são bastante rápidos e menos dispendiosos comparativamente com a utilização de ME. A utilização de ME, principalmente de ME de transmissão, tem sido vantajosa para a caracterização morfológica dos diferentes fagos conseguindo-se a observação de estruturas (por exemplo, cauda e cabeça) e, também, a determinação do tamanho dos capsídeos. A utilização para efetuar a contagem de fagos totais não é, no entanto, a mais correta uma vez que ocorrem problemas de ordem técnica na recolha e coloração de fagos, o *washing off*.

Além disso, estes métodos de coloração por microscopia não permitem distinguir entre partículas não infecciosas e infecciosas como é dado pela UFP (WHITHEY *et al.*, 2005; SILLANKORVA, 2004). Para estudar as interações que decorrem entre o fago e o hospedeiro é essencial utilizar métodos quantitativos para avaliar o que se sucede ao longo de um período de infecção fágica e para compreender o efeito de alguns parâmetros, tais como: temperatura, meio de cultura, fase de crescimento celular, pH, entre outros. Estes métodos permitem uma detecção baixa de fagos, são reprodutíveis, práticos, simples, rápidos e não dispendiosos (SILLANKORVA, 2004).

4.7 Biodiversidade dos bacteriófagos

O tamanho global da população estimada de fago é extraordinariamente alta. Por exemplo, presume-se que os habitantes aquáticos têm números de fagos totais acima de 10^{31} (FARRAG *et al.*, 1989 & RAYA *et al.*, 2006); ecossistemas terrestres revelaram 10^7 bacteriófagos por grama de solo (FARRAG *et al.*, 1989) e de esgoto apresentam números de fagos totais na faixa de 10^8 - 10^{10} por mililitro (WAGENAAR *et al.*, 2005). Também tem sido mostrado que os fagos superam as bactérias em todos os ambientes estudados gerando a hipótese de que é a forma de vida predominante na biosfera (FARRAG *et al.*, 1989; BRADING *et al.*, 1995; SIMÕES *et al.*, 2005). Segundo Hendrix (2002) e Hanlon (2007), os bacteriófagos são a forma de vida mais numerosa na face da Terra; sendo dez vezes mais numerosas do que as bactérias.

Os bacteriófagos podem ser encontrados em todos os ambientes onde as bactérias crescem. É possível encontrar os bacteriófagos nos desertos, nas fontes termais, no Mar do Norte e em águas polares (PRIGENT *et al.* 2005; LIN *et al.* 2010; BREITBART *et al.* 2004; WICHELS *et al.* 1998; SÄWSTRÖM *et al.* 2008). Além disso, algumas pesquisas demonstram que também é possível detectar fagos em águas subterrâneas e superficiais, solo, alimentos (por exemplo, chucrute e vinho), esgotos e lamas (LUCENA *et al.* 2006; YOON *et al.* 2002; DAVIS *et al.* 1985; KUMARI *et al.* 2010; TARTERA e JOFRE, 1987). Esses microorganismos, também podem ser isolados de humanos e animais (por exemplo, nas fezes, urina, saliva, entre outros) (GANTZER *et al.* 2002; CAROLI *et al.* 1980; BACHRACH *et al.* 2003; NIGUTOVÁ *et al.* 2008.; KELLER e TRAUB 1974). Os Fagos são capazes de penetrar os diferentes órgãos e tecidos, incluindo o sistema nervoso central, e fazem parte da

microbiota intestinal juntamente com as bactérias (FRENKEL & SALOMÃO, 2002; KAMEYAMA *et al.*, 2001). Para Weinbauer (2004), os fagos são responsáveis por 10 a 80% da mortalidade bacteriana total em ecossistemas aquáticos e são fatores, importantes, limitantes das populações desses micro-organismos.

Os bacteriófagos que residem em ambientes semelhantes podem ser de grande variedade em formas morfológicas. Ackermann (2007) classificou cinco tipos de fagos que ocorrem em fontes termais como SH1, STIV, *Ampullaviridae*, *Bicaudaviridae* e *Globuloviridae*. Segundo esse autor, SH1 tem a mesma estrutura que os *Tectiviruses* sendo poliédricos. Os fagos deste grupo (SH1 e *Tectiviruses*) foram encontrados apenas em um lago hipersalino na Austrália. Os fagos STIV também são poliédricos. Podem infectar bactérias hipertermofílicas e foram encontrados pela primeira vez em fontes de águas quentes no Yellowstone National Park (nos EUA) (ACKERMANN, 2007).

Prigent *et al.* (2005) confirmam a existência de bacteriófagos no deserto do Saara onde foram encontrados doze tipos morfológicos de fago em amostras de areia. Alguns tipos apresentaram capsídeos icosaédricos (sem envelope), um grande genoma, uma cauda com uma bainha contrátil e uma placa de base com fibras terminais e, portanto, foram classificados como membros da família *Myoviridae*. Dois grupos com longos capsídeos hexagonais foram classificados para a família *Podoviridae*, e os outros quatro tipos com longas caudas não contrátil foram classificados como *Siphoviridae* e apresenta estrutura mais simples com cauda, e com menor genoma (em média, cerca de 100 kb). Esses pesquisadores demonstraram que em condições adversas, como a luz ultravioleta forte, dessecação, e grandes variações de temperatura, fagos pertencentes à família *Myoviridae* são capazes de sobreviver em ambiente extremamente seco, através de localização intercelular em confinamento no biofilme criado por um hospedeiro bacteriano. Lasobras *et al.* (1997) sugeriram que pode haver alguma relação entre a estrutura do fago e sua capacidade de sobrevivência sob condições ambientais adversas. Segundo esse autor, em sua análise de fagos de esgoto e em água poluída, a maior parte pertencia à família *Siphoviridae*. Para Lasobras *et al.* (1997), os fagos da família *Siphoviridae* parecem ser os mais resistentes a condições adversas. No entanto, parece que não há confirmação fundamental deste pressuposto, porque até o momento não há estudo comparativo sistêmico.

4.8 Fatores que interferem no ciclo de vida dos bacteriófagos

São vários os fatores que interferem no ciclo de vida dos bacteriófagos. Tais fatores podem se agrupar em: fatores físico-químicos como acidez, salinidade e concentração de íons que determinam a ocorrência, viabilidade e sobrevivência de bacteriófagos. Esses fatores podem inativar um fago através da supressão de seus elementos estruturais (cabeça, cauda e envelope), perda de lipídeos, e/ou DNA e mudanças estruturais (ACKERMANN *et al.* 2004).

4.8.1 Fator físico: a temperatura

A temperatura tem sido apontada como fator crucial para a manutenção da viabilidade dos bacteriófagos (OLSON *et al.*, 2004; NASSER & OMAN 1999; YATES *et al.*, 1985; HURST *et al.*, 1980). De acordo com esses pesquisadores, a temperatura desempenha um papel fundamental na fixação, penetração, multiplicação e na duração do período latente (no caso de fagos lisogênicos). Segundo Tey *et al.* (2009), temperaturas mais elevadas podem prolongar a duração do estágio de latência dos bacteriófagos. Além disso, a temperatura determina a ocorrência, viabilidade e armazenamento de bacteriófagos. Os bacteriófagos podem ser encontrados em fontes de água quente que podem alcançar temperaturas de 40 a 90 °C. Os bacteriófagos isolados de fontes termais como na Califórnia, foram testados em baixas e altas temperaturas (BREITBART *et al.* 2004). Breitbart *et al.* (2004) observou que mais de 75% das partículas fágicas permaneceram intactas mesmo quando incubadas no gelo (em torno de 0°C). Os fagos foram mais sensíveis quando fervidos a 105 °C, já que apenas 18-30% das partículas fágicas permaneceram intactas. Mocé Livina *et al.* (2003) testaram a resistência térmica de colifagos somáticos, fagos infectando *Bacteroides fragilis*. A inativação de fagos ocorreu em lamas desidratadas e em esgoto bruto. Em ambos os casos, observaram que os fagos foram mais resistentes ao tratamento térmico que as bactérias. Além disso, o F-fago específico foi menos termicamente resistente que outros fagos testados, incubados tanto no lodo e esgoto. (BREITBART *et al.* 2004 e MOCÉ LIVINA *et al.*, 2003) O nível da redução do título de fagos *E. coli* somáticos que ocorrem naturalmente nas lamas após tratamento térmico a 60 °C foi de 1,0 log em 60 min, e 80 °C foi de 2,5 log. Caldeira e Peabody (2007) investigaram o papel de dissulfeto de ligações cruzadas na proteção de fagos contra desnaturação térmica. Conforme Buzrul *et al.* (2007) as experiências realizadas com esses

fagos expostos a temperatura mais baixa mostraram que apenas dois fagos foram inativados e para os fagos expostos a 90 °C metade dos investigados foram inativados.

Estudos de Atamer *et al.* (2008) mostraram que cerca de 40% dos fagos de /ou que infectam *Lactococcus lactis* isolados de diferentes laticínios alemães sobreviveram ao aquecimento a 80 °C por 5 min, quando suspensos em leite. No entanto, quase todos os fagos foram completamente inativados quando a temperatura foi elevada para 95 °C.

A estabilidade de fagos em baixas temperaturas que infectam *Pseudomonas fragilis*, isolados de alimentos refrigerados, foi determinada a 60 °C (WHITMAN e MARSHALL, 1971). Em experiências, os autores perceberam que depois de uma inativação de 30 minutos dos fagos *Pseudomonas* PS1 e WY, a média das reduções na sobrevivência do fago foi mais de 99% e 39%, respectivamente. Houve 15% e 72% diminuição do número de placa, após manter os fagos em ágar a 45 °C por 2 minutos e 10 minutos, respectivamente. A temperatura de armazenamento dos bacteriófagos é o fator mais importante que determina a atividade do fago. Thorne e Holt (1974) observaram fagos como o *Bacillus cereus* CP-51, que foram sensíveis a baixas temperaturas e sobreviveram melhor em temperatura ambiente, mas o armazenamento a longo prazo de fagos em temperatura ambiente não é geralmente recomendado (MULLAN, 2001).

Jepson e March (2004) testaram a influência do tempo de armazenamento dos fagos em diferentes temperaturas. Nesse estudo os autores perceberam que os fagos foram resistentes a repetidos procedimentos de congelamento e descongelamento em intervalos curtos sendo que esse procedimento teve uma influência negativa sobre a estabilidade dos fagos. Da mesma forma, Olson *et al.*(2004) recomendam 4 °C como a temperatura ótima para o armazenamento de fagos por período curto de tempo (não superior a 40 dias) em águas residuais. Para proteger os fagos da inativação durante períodos mais longos, eles devem ser mantidos a -80 °C. O armazenamento a -20 °C do bacteriófago não é recomendada porque a estrutura de cristal de gelo pode causar sua destruição, como foi anteriormente demonstrado por Warren e Hatch (1969). Uma adição de glicerol 5 a 10% para a suspensão do fago pode garantir a viabilidade segura e capacidade de infectar para 30 dias a -20 °C ou -70 °C (OLSON *et al.* 2004). Segundo as observações de Ackermann *et al.* (2004), diferentes fagos liofilizado com a adição de glicerol a 50% poderia sobreviver muitos anos como exemplo, não houve perda de fagos liofilizado da família *Siphoviridae* após 21 anos.

4.8.2 Fator físico e químico: pH e Salinidade (osmotolerância)

Outro fator importante que influencia a estabilidade do fago é a acidez do meio ambiente. Davis *et al.* (1985) descreveu a ocorrência de fagos específicos para bactérias do ácido láctico em vinho. O fator limitante para a atividade do fago foi de um pH abaixo de 3,5 e SO₂ em uma concentração total de 50 mg/L. Os Fagos podem persistir em um ambiente ácido, como o chucrute, o que foi descrito por Lu *et al.* (2003). Esses autores isolaram fago de um tanque de fermentação de chucrute (pH <3,5) após 60 até 100 dias. Kerby *et al.* (1949) pesquisaram a estabilidade do fago T7 em tampões (citrato, citrato-fosfato, fosfato, borato-fosfato e borato) de diferentes pH (3 a 11) para o período de incubação de uma a duas (1 a 2) semanas a 0,5 a 2 °C. Os pesquisadores observaram e concluíram que o ideal para a estabilidade física do fago foi pH 6 a 8 para o armazenamento de longo prazo. O fago T7 foi mais estável em tampão fosfato em pH 7, e perdeu apenas 20% de sua atividade após 2 semanas. Além disso, apresentava-se instável em pH <4 (após 96 h em tampão citrato ou citrato-fosfato, que perdeu quase toda a sua capacidade infecciosa), e em pH 3, o fago perdeu completamente a atividade a partir de 1 hora. No lado alcalino, mesmo em pH 9, manteve pelo menos 30% de sua capacidade infecciosa após duas semanas. (KERBY *et al.* 1949)

Em tampão borato de pH >10, a perda quase completa da atividade T7 foi observado após 24h. Sharp *et al.* (1946) pesquisaram a estabilidade do pH do fago T2 na faixa de pH 2 a 11 para 1 hora, em um dia, e uma a quatro (1 a 4) semanas. Segundo os autores, no geral, o fago permaneceu estável em uma ampla faixa de pH de 5 a 9, com o seu máximo de estabilidade em pH 5 a 6. O pH ótimo foi de 5 a 6, após 30 minutos de incubação, o título do fago diminuiu apenas 11%, enquanto que em pH 7,0, manteve apenas 1% da Unidade formadora de Placa (UFP) inicial (107). Segundo os pesquisadores, estas observações podem indicar que a variação do pH ambiental pode proteger a atividade dos fagos a uma temperatura baixa.

A salinidade e choque osmótico de íons têm sido apontados como inativadores de bacteriófagos (DAVIS *et al.* 1985; KERBY *et al.* 194; SHARP *et al.*, 1946). Whitman e Marshall (1971) observaram que fagos psicrófilos de *Pseudomonas* (WY e PS1) apresentaram redução de persistência em soluções altamente concentrada de NaCl ou sacarose. O fago PS1 diluído em 4 mol/L NaCl apresentou diminuição de 99% na viabilidade, enquanto que a viabilidade do fago WY foi reduzido em apenas 26%. No entanto, uma solução de sacarose 2 mol/L causou uma diminuição da viabilidade em PS1 de 50% e em WY de 48%. Os mesmos pesquisadores observaram que, em citrato de 0,1% de ágar, a viabilidade de ambos os fagos

foi reduzido em 30%. Os vários bacteriófagos foram isolados de água do mar de diferentes salinidades. Wichels *et al.* (1998) estudaram 22 fagos que se encontravam na água perto de Helgoland no Mar do Norte. Todos tinham caudas e cabeças icosaédricas de 50,2-99,3 nm, e eles foram classificados em três famílias diferentes: 11 fagos para *Myoviridae*, 7 para *Siphoviridae*, e 4 para *Podoviridae*. Esses fagos não apresentaram semelhança na estrutura do DNA.

Adams (1949) verificou a estabilidade dos bacteriófagos T5 incubados a 37 °C em soluções salinas (tampão fosfato, além de citrato além de cálcio). O autor observou que o fago se manteve estável na solução de íons de cálcio, mas perdeu a sua atividade em tampão fosfato, ao passo que foi rapidamente inativado em solução de citrato. Nesse mesmo estudo, não foram detectadas partículas fágicas após 2 horas de incubação em 10 mmol/L com tampão fosfato citrato de 2 mmol/L (pH 7). O autor também mostrou que os metais bivalentes em concentrações milimolar podem impedir a inativação de fagos supondo que o aumento da estabilidade de T5 na presença de diferentes soluções aniônicas resultam na formação do complexo da partícula fágica e íons. Mylon *et al.* (2009) pesquisaram a estabilidade do fago MS2 em diferentes soluções de LiCl, NaCl, KCl, CaCl₂ e em concentrações de 0,01-1,0 mol/L. Os estudos revelaram que os sais monovalentes não influenciaram na agregação do fago. Em contraste, a taxa de crescimento dos fagos aumentou com o aumento da concentração de sal. Estudos de Kuo *et al.* (1971) revelaram que a partículas fágica expostos a 3 mmol/L de citrato de sódio promoveram a decomposição no DNA. Pesquisa de Gupta e Yin (1995) mostraram que o bacteriófago T7 perdeu a sua atividade com meia-vida após 30 segundos, quando foi exposta a 6 mol/L de uréia usado como componente de desnaturação. Os experimentos de Whang *et al.* (1996) mostraram que os íons de 1 mmol/L de metal podem retardar ou acelerar a inativação do fago T7 através da uréia. Segundo os autores, íons metálicos divalentes (Mg²⁺, Ca²⁺, Co²⁺, Ni²⁺) estabilizam atividade na presença de uréia, em contraste com trivalentes (Al³⁺ e Au³⁺) que desestabilizam. A presença de um dos íons causou perda de título de fago mais de 50 vezes, mesmo em concentrações de 0,25 mmol/L.

4.9 Utilidade e aplicação dos bacteriófagos

A descoberta de bacteriófagos, além do estudo sobre sua natureza biológica, despertou o interesse em utilizá-los em várias áreas do domínio de engenharia genética. Atualmente a aplicação dos bacteriófagos vai além do tratamento e prevenção de doenças infecciosas (SULAKVELIDZE *et al.*, 2001). Segundo os autores algumas pesquisas revelaram um aumento da resistência bacteriana a agentes antimicrobianos. Deste modo, aguçou-se o interesse e atenção para a terapia com utilização de fago. Esta alternativa foi reavaliada como terapêutica biológica para eliminar bactérias patogênicas. O procedimento para a utilização de fagos como agentes terapêuticos é bastante simples e fagos têm apresentado muitas vantagens sobre os agentes antimicrobianos, tais como especificidade contra um hospedeiro ou vários hospedeiros que não afeta a microbiota natural; capacidade de autorreplicação no local da infecção sem efeitos colaterais graves. Para esse autor, a produção dos fagos é simples, barata e ecologicamente correta, ou seja, com notáveis benefícios ao meio ambiente e a saúde, com possibilidade de contribuir com desenvolvimento de um modelo econômico e social sustentável.

A indústria alimentar, também, tem utilizado os bacteriófagos como ferramenta para conservação e melhoramento de alimento e a saúde de animais. Os fagos têm sido estudados e aplicados a produtos alimentares de origem animal e vegetal (SILLANKORVA *et al.*, 2008). Na agropecuária, a utilização dos fagos tende a diminuir a população de bactérias patogênicas e minimizar as doenças dos animais (LOC CARRILLO *et al.*, 2005; ATTERBURY *et al.*, 2007; WAGENAAR *et al.*, 2005). Neste campo, os fagos podem ser aplicados em diferentes fases de processamento e em todas as áreas onde os animais tem tido contato. Os fagos têm sido aplicados com sucesso na criação de gado bovino e de ovinos (SHENG *et al.*, 2006; RAYA *et al.*, 2006). Os fagos, também, têm sido utilizados no desenvolvimento de pesquisas para recuperação de áreas contaminadas por substâncias derivados de petróleo. (PUAPERMPPOONSIRI *et al.*, 2009).

4.9.1 Fagoterapia

Os bacteriófagos são um dos vírus mais estudados e tem contribuído no desenvolvimento da biologia molecular. A ação lítica dos bacteriófagos sobre as bactérias

patogênicas permitiu seu uso como alternativa terapêutica sobre infecções bacterianas. Sua eficácia tem sido provada inclusive contra micro-organismos resistentes a antibióticos. (VISPO & PUCHADES, 2001). Segundo Vispo e Puchades (2001), as pesquisas com os fagos estiveram relacionadas com a definição da natureza, principalmente a capacidade de provocar a lise celular de bactéria que serviu de base para muitos trabalhos relacionados ao uso terapêutico. Estudos laboratoriais (*in vitro*) sobre os bacteriófagos permitiram aos pesquisadores usar fagos específicos para diferenciar entre várias espécies de bactérias e foram desenvolvidos métodos de diferenciação que se tornaram, atualmente, úteis nas pesquisas epidemiológicas (BRUYNOGUE & MAISIN, 1987).

O uso indiscriminado de antibiótico tem como consequência a seleção artificial das bactérias. O crescimento da população resistente é um fato e está em ascendência. Neste caso, os antibióticos usados, atualmente, têm sido eficientes no tratamento de doenças bacterianas, mas podem, no futuro, ser ineficazes. (SULAKVELIDZE *et al.*, 2001; BARROW, 2001).

Estudos desenvolvidos no período de 1987-1999 mostraram que a terapia com bacteriófagos é muito mais efetiva que com antibióticos (WEBER-DABROWSKA *et al.*, 2000). Segundo Weber-Dabrowska *et al* (2000), nesse estudo foram selecionados pacientes com enfermidades infecciosas persistentes causadas por cepas resistentes a antibióticos. Inicialmente foram isoladas e caracterizadas as cepas patogênicas, se determinou sua sensibilidade a bacteriófagos e se preparou um extrato estéril de fagos que foi administrado por várias vias. Ademais o efeito terapêutico — desaparecimento dos sintomas e exames bacteriológicos negativos demonstrou-se que bacteriófagos incrementam a proteção contra infecções bacterianas mediante destruição dos micro-organismos e regulação do sistema imunitário. Estas alternativas podem ser usadas em combinação com agentes antimicrobianos como dos antibióticos ou como único tratamento nas infecções ocasionadas por patógenos de importância clínica, por exemplo, as cepas dos gêneros *Enterococcus*, *Mycobacterium*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* e *Staphylococcus*, entre outras. (WEBER-DABROWSKA *et al.*, 2000). A fagoterapia, segundo Nallelyt *et al* (2010), apesar dos bacteriófagos terem sido descritos desde 1896 a 1917 e utilizados como terapia nas enfermidades infecciosas em humanos, continua sendo uma alternativa viável no tratamento de enfermidades, principalmente, causadas por bactérias resistentes a antibiótico.

Apesar da fagoterapia em alguns países do Ocidente ter sido abandonada nas décadas de 1950 a 1980, na Rússia, Polônia, Geórgia e na Índia, as pesquisas continuaram (BRUTTIN & BRUSSOW, 2005 e STROJ *et al.*, 1999). Na Geórgia, o centro Tbilisi, fundado por d'Herelle e Eliava tem sido o produtor de cepas de fagos, na Polônia o Instituto Hirzfield é o

que tem proporcionado dados importantes sobre o tratamento de mais de 5500 casos de infecções bacterianas (como as enfisemas, peritonites, osteomielites, entre outras) em humanos. Os fagos utilizados para o tratamento dessas infecções foram administrados por via oral, prévio tratamento dos pacientes com antiácidos e gelatina, para proteger aos fagos da acidez gástrica e posteriormente se comprovava que os fagos chegavam a corrente sanguínea. Nesse estudo, os investigadores reportaram que 90% dos pacientes tratados, se recuperaram satisfatoriamente com a cura da doença, sarando as feridas e as fístulas (VISPO & PUCHADES, 2001; LÓPEZ, 2005).

Para terapia humana, os fagos têm sido administrados por várias vias, por exemplo, oral, tópica, intravenosa, intrapleural sem complicações sérias associadas com seu uso, esse fato pode ser devido a existência dos bacteriófagos no ambiente. No caso do Ocidente a pesquisa sobre a fagoterapia é incrementada consideravelmente, inclusive têm surgido indústrias dedicadas a investigar o uso terapêutico dos bacteriófagos (SULAKVELIDZE *et al.*, 2001). Entretanto, alguns pesquisadores concordam que o maior obstáculo para a terapia com bacteriófagos é o sistema imunitário, que tende a eliminá-los rapidamente. Essa evidência sugere que os fagos não permanecem viáveis na corrente sanguínea ou nos tecidos do organismo por um tempo suficiente até alcançar locais infetados e infectar as bactérias patogênicas. Essa desvantagem potencial, associada ao aparecimento de bactérias resistentes a antibióticos, tem propiciado a busca de variantes de fagos capazes de evadir os mecanismos do sistema imunitário (VISPO & PUCHADES, 2001). De acordo com Merrill *et al.* (1996), para essa busca de variantes de fagos, são desenvolvidos vários métodos, mas os mais úteis são os da seleção de fagos que podem ou não ser mutados e que resistem por mais tempo de vida nos tecidos de organismos e a obtenção de bacteriófagos modificados geneticamente que apresente na sua superfície peptídeos ou moléculas que antagonizem uma ou varias funções do sistema imunitário. Dentro das moléculas que se podem expressar no capsídeo dos fagos filamentosos com possibilidades de impedir a inativação do vírus, se encontram os peptídeos e moléculas antagonistas de quaisquer vias do sistema complementar, as interleucinas e outras citosinas, assim como proteínas glicosiladas e fatores de inibição. (MERRIL *et al.*, 1996)

O surgimento de cepas bacterianas multirresistentes foi o que desencadeou a retomada de pesquisa com bacteriófagos nos países do ocidente. Os pesquisadores desses países retomaram seus interesses a esta alternativa, não só para o tratamento das infecções em aves, caprinos, pisciculturas, plantas, tratamento de água poluída e tratamento em humanos. De tal modo que são usados fagos contra *Pseudomonas*, *Staphylococcus aerus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Aeromonas hidrofila* e *Mycobacterium*

tuberculosis, entre muitas outras bactérias resistentes a vários antibióticos, incluindo ampicilina, vancomicina, entre outros com diferentes graus de eficácia que variam de 75 a 95% e algumas vezes 100%.(GILL *et al.*'2006; MITCHEL & ROUF, 1983; WATTANABE *et al.*, 2006).

4.9.2 Indústria alimentar

A grande maioria dos estudos relatados na área da pecuária estão relacionados a proteção e conservação de produtos como carnes e ovos que frequentemente são contaminados com *E. coli*, *Salmonella* e *Campylobacter*. Muitos desses estudos relatam reduções com sucesso das cargas de diferentes agentes patogênicos com o uso dos fagos (LOC CARRILLO *et al.*, 2005; SMITH *et al.*, 1983; HUFF *et al.*, 2006; WAGENAAR *et al.*, 2005). Por exemplo, o tratamento de frangos e vitelos tem mostrado proteção dos animais contra a septicemia e meningite provocada por *E. coli* (HUFF *et al.*, 2006; BARROW *et al.*, 1998 e SAJJAD *et al.*, 2004).

A indústria de alimentos enfrenta uma série de desafios para manter os produtos seguros e livres de micro-organismos patogênicos. No entanto, anualmente, existem inúmeros relatos de hospitalização, doenças e até morte de pessoas devido a uma variedade de patógenos que contaminam os alimentos. Existem mais de 200 patógenos conhecidos de origem alimentar, incluindo vírus, bactérias e parasitas que podem causar doenças transmitidas por alimentos, juntamente com as toxinas, contaminantes químicos e metais. (SILLANKORVA *et al.*, 2008)

O uso de bacteriófagos tem conquistado espaço na indústria alimentar, dado que os resultados obtidos nas pesquisas e nos experimentos realizados têm sido plausíveis. (GILL *et al.*'2006; MITCHEL & ROUF, 1983; WATTANABE *et al.*, 2006). Conforme esses autores, um dos produtos da pesquisa com fago para aplicação na indústria alimentar destaca-se o LISTEXTM 100PM que é reconhecido pela United States Department of Agriculture (USDA) podendo ser incorporado nos processos de produção de alimentos. A liberação de outro produto à base de fago chamado BacWashTM, foi autorizada pelo USDA para controlar *Salmonella* e *E. coli* O157: H7. O BacWashTM fago foi criado especialmente para ser utilizado em animais antes do abate e ele pode ser aplicado como uma lavagem ou pulverizado diretamente no animal vivo. A agência de Proteção Ambiental (EPA) aprovou, em

2005, o AgriPhageTM que é um produto para fins de controle de *Xanthomonas campestris* spv, *Vesicatoria* e *Pseudomonas syringae*. O ListShield que atua especificamente contra *Listeria monocytogenes* e Ecoshield contra *Escherichia coli* foram aprovados pela FDA para seu uso em produtos de consumo humano.

4.9.3 Agropecuária

Os fagos são capazes de eliminar biofilmes, ainda, na fase inicial (ou células aderidas) nas plantas ou frutas (SILLANKORVA *et al.*, 2008). Patógenos de plantas raramente são perigosos para os seres humanos, porém é uma das principais causas de perda da produção agrícola. Patógenos de plantas, tais como *Ralstonia solanacearum* e *Pseudomonas syringae* provocam manchas foliares e ferrugens e afetam uma grande variedade de produtos como batata, tabaco, tomate, banana, amendoim e de soja. Pesquisa de fagos na horticultura e agricultura visa proteger as plantas, legumes e frutas da propagação de doenças bacterianas. (FLAHERTY *et al.*, 2000; IRIARTE *et al.*, 2007). Em tomate, pimenta e plantas, entre outros, estes produtos podem diminuir mancha bacteriana e pode ser usado em explorações ao nível pré-colheita, diluído antes da dispersão e pode ser aplicado às culturas por diferentes meios, tais como a irrigação por gotejamento ou usando equipamento de pulverização do solo. Uma vez que a etapa de adsorção ocorre, os fagos começam a usar a maquinaria dos hospedeiros para se replicarem e centenas de novas partículas de fago são liberadas através de ruptura da célula hospedeira. Estes fagos podem iniciar um novo ciclo de infecção do hospedeiro (SILLANKORVA *et al.*, 2008).

A aplicação de fagos, na agricultura, pode ser comprometida devido a fatores ambientais, tais como a irradiação da luz solar - especialmente dos raios ultravioleta (UV) - da temperatura e exposição a bactericidas. Estudos mostraram que, para que a ação dos fagos no contexto da agricultura seja bem sucedida, devem-se seguir alguns passos, como a aplicação desses vírus nos horários em que há baixa radiação de UV, criação de fórmulas de fagos que apresentem uma mistura com outros componentes que ajudam a manter a viabilidade das partículas de fago protetores (por exemplo, leite desnatado) que apresentam um alto potencial como agentes de controle de doenças de plantas (FLAHERTY *et al.*, 2000; IRIARTE *et al.*, 2007; JONES *et al.*, 2007).

A grande maioria dos estudos relatados neste campo ocorre na criação de aves onde os

animais e produtos (como carnes e ovos) são frequentemente contaminados com *E. coli*, *Salmonella* e *Campylobacter*. Muitos desses estudos relatam reduções deste patógeno com sucesso (LOC CARRILLO *et al.*, 2005; SMITH *et al.*, 1983; HUFF *et al.*, 2006; WAGENAAR *et al.*, 2005). Em algumas pesquisas, os fagos apresentaram a capacidade de retardar o aparecimento da bactéria e conseqüentemente prolongaram o período de vida dos animais (BARROW *et al.*, 1998; HUFF *et al.*, 2006; BARROW *et al.*, 1998; SAJJAD *et al.*, 2004). Animais tratados com fagos que infectam *Campylobacter jejuni* mostraram diminuição na quantidade deste patógeno.

4.9.4 Saneamento e tratamento de água

A água em muitas realidades sociais, sem exceção de países, tem sido o destino final de diversos materiais contaminados e poluentes (BRANCO, 1986). Segundo Branco (1986) os poluentes carreados pela atmosfera e solo infiltram-se até lençóis freáticos e a água subterrânea em geral, escorre para os lagos, rios e oceanos, causando a poluição e contaminação. Entre esses poluentes, destacam-se os esgotos domésticos e industriais lançados em corpos aquáticos, na maioria das vezes sem tratamento prévio. A matéria orgânica contida nestas águas fornece suprimentos às bactérias aeróbias decompositoras, e quanto maior a concentração de matéria orgânica, maior a população desses organismos decompositores e, portanto, maior a quantidade de oxigênio por eles consumido. A água não tratada destinada ao consumo humano tem sido um dos principais problemas de saúde da população (Mais de 90% das doenças infecciosas são transmitidas por água contaminada, principalmente com esgotos domésticos), em algumas situações, como nos países em desenvolvimento, onde há deficiências de saneamento básico e de tratamento de água (BRANCO, 1986; CEBALLOS, 2000).

De acordo com Ceballos (2000), a água utilizada para o consumo humano, para a irrigação e outras atividades, deve apresentar padrões físico-químicos e sanitários apropriados para evitar riscos ao meio ambiente e preservar a saúde das pessoas e animais. Entre os micro-organismos comprometedores da saúde destacam-se vírus e bactérias do trato intestinal.

A diminuição dos micro-organismos patogênicos presentes nas águas residuárias e diminuição do número de bactérias dos esgotos do grupo dos coliformes ou patogênicas ocorre, segundo Branco (1986), entre outros processos por exemplo, pela precipitação de

partículas que arrastam as bactérias para o fundo, pela flocculação e adsorção, pela falta de substâncias nutritivas para as bactérias de vida livre e conseqüentemente para as patogênicas, através da presença e uso de bacteriófagos

O controle da eliminação de micro-organismos, através dos bacteriófagos, requer a presença de bactérias hospedeiras viáveis para sua replicação. Os fagos, ao se replicarem, causam a lise da bactéria usando-se micro-organismos indicadores de contaminação fecal como os coliformes fecais e mais recentemente, os colifagos e os bacteriófagos F-específicos. Estes últimos são considerados prováveis indicadores da presença de vírus patogênicos no ambiente aquático. Sua detecção é importante na avaliação sanitária de águas superficiais e de efluentes de Estações de Tratamento de Esgotos ou de água de consumo humano e de irrigação, por serem mais resistentes que os coliformes aos diferentes tipos de tratamento e aos desinfetantes como cloro, luz ultravioleta e ozônio. (FARRAH,1987).

Bacteriófagos que infectam as estirpes hospedeiras de espécies do gênero *Bacteroides* são utilizados com indicadores de contaminação fecal em água. Algumas cepas não são distinguidas entre as fontes de poluição, tais como *Bacteroides fragilis* RYC2056 (PUIG *et al.*, 1999), mas outros são muito específicos para a poluição fecal humana, tais como *Bacteroides taiotaomicron* GA17 (PAYÁN *et al.*, 2005). Segundo os autores, um método tem sido descrito para o isolamento de um hospedeiro adequado com a capacidade de detectar bacteriófagos a partir de uma dada fonte. Este método tem sido aplicado com sucesso em várias áreas geográficas para isolar cepas que discriminam os fagos das fezes humanas (PAYÁN *et al.*, 2005;. EBDON *et al.*, 2007; VIJAYAVEL *et al.*, 2010).

As diferenças no tipo de alimentos consumido por um grupo populacionais podem apresentar variações na composição da microbiota intestinal e conseqüentemente o tipo de bacteriófagos presentes no meio (MAI, 2004; ZOETENDAL *et al.*, 2004; DETHLEFSEN *et al.*, 2006). Os colifagos, por exemplo, são bacteriófagos específicos de *E. coli* e foram considerados indicadores microbiológicos potenciais de qualidade da água e da eficiência de estações de tratamento de esgoto e por estarem presentes em águas que contém *E. coli*. Apresentam-se no esgoto em número maior que nas fezes humanas e desenvolvem maior resistência ambiental que as bactérias (BITTON, 1987).

Atualmente são quantificados os colifagos somáticos, que se aderem à receptores da parede celular bacteriana e os bacteriófagos F-específicos, que se adsorvem ao pili F bacteriano encontrado nas cepas (F+) de *E. coli* (IAWPRC, 1991). Segundo Ceballos (2000), os colifagos somáticos são usados como indicadores de contaminação fecal, principalmente quando há necessidade de resultados rápidos, em 4 a 6 horas.

4.9.5 Recuperação de áreas degradadas

A cada ano centenas de milhões de litros de petróleo são despejados no ambiente através de fontes naturais e antropogênicas. As infiltrações naturais marinhas do petróleo por si só seria suficiente para cobrir todos os oceanos do planeta em uma camada de óleo de 20 moléculas de espessura. Mas o fato do planeta não ser inundado com óleo deve-se à eficiência e versatilidade das redes de micro-organismos que degradam hidrocarbonetos, alguns dos quais recentemente começaram a revelar os segredos de quando e como eles exploram hidrocarbonetos como fonte de carbono e energia (HEAD *et al.*, 2006).

Algumas pesquisas sobre processos de recuperação de áreas contaminadas pela substância derivados de petróleo estão sendo desenvolvidas, principalmente sobre ação de bacteriófagos, em vista da sua aplicação para degradar petróleo (HEAD *et al.*, 2006). De acordo com Head *et al.* (2006), os estudos de biorremediação tendem a se concentrar sobre os micro-organismos que degradam os contaminantes. No entanto, esses micro-organismos fazem parte de uma rede ecológica, que envolve muitas interações diretas e indiretas com outros membros da comunidade e do meio ambiente (e, portanto, é influenciada por variáveis ambientais, tais como disponibilidade de nutrientes ou parâmetros físico-químicos). Tais interações incluem competição por nutrientes limitantes, predação por protozoários, lise por fagos e as interações de cooperação que a degradação aumenta (Fig. 4) (HEAD *et al.*, 2006).

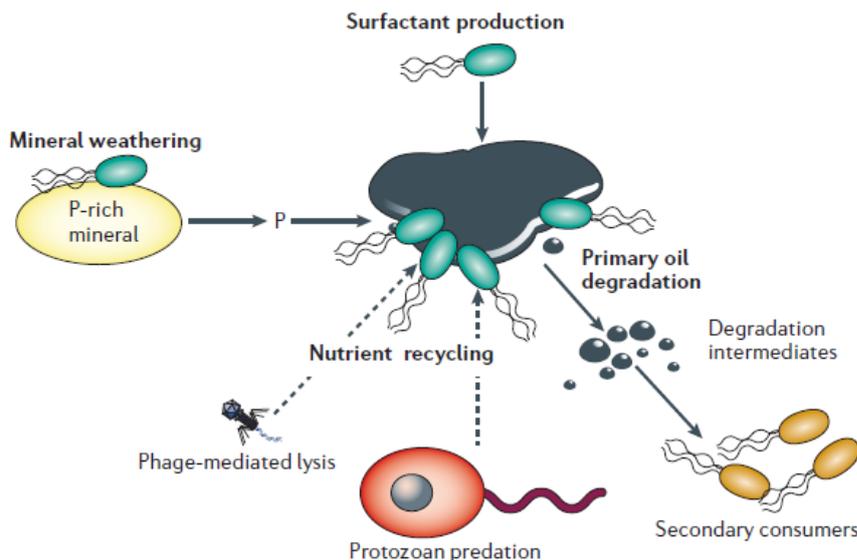


Figura 4: Esquema ilustrativo de rede de degradação microbiana de petróleo primário.
Fonte: Head *et al.*, 2006

A figura 4 indica que a biodegradação do petróleo envolve componentes biológicos mais do que apenas os micro-organismos que atacam diretamente o óleo (os degradadores de petróleo primários e mostra que os degradadores de petróleo primários interagem com esses componentes. Bactérias degradadoras de óleo são ilustradas em verde. Setas sólidas indicam fluxos de materiais, e as setas com linhas descontínuas indicam interações diretas (por exemplo, a lise pelo fago e predação por protozoários). Para simplificar, apenas uma função é atribuída a um micro-organismo neste esquema. (HEAD *et al.*, 2006)

A participação dos fagos, pelo seu caráter predativo e/ou pela lise dos hospedeiros, estimula a reciclagem intrínseca de nutrientes, através do aumento do volume da biomassa. Esta ação tem sido apontada como uma alternativa à adição de nutrientes para estimular a biorremediação. O volume da biomassa pode ser aumentado pelo fago lise e através da predação pelos protozoários. A poluição por hidrocarbonetos pode induzir o profago (e pode funcionar como um estressor geral), resultando na lise de uma grande proporção da comunidade bacteriana (COCHRAN *et al.*, 1998; JANG & PAUL, 1997), e isto pode explicar as mudanças na composição da comunidade que são independentes da degradação do óleo (ROLING *et al.*, 2002). Nas condições anaeróbicas e aeróbicas o número de protozoários que preda sobre as bactérias tende a aumentar em resposta a um evento de poluição, devido ao aumento do número de bactérias que ocorre como resultado da maior concentração de substratos disponíveis. Predadores afetam, indiretamente, a biodegradação de contaminantes,

através de sua capacidade para, seletivamente, degradar e controlar a biomassa de bactérias (KINNER *et al.*, 2002 & NOVARINO *et al.*, 1997).

A influência de protozoários sobre a biodegradação é muitas vezes negativa, porque diminui o número de bactérias degradativas, em comparação com a situação na ausência de predadores (KOTA *et al.*, 1999). No entanto, a predação demonstrou, consideravelmente, estímulo na degradação bacteriana de tolueno e benzeno numa base por célula (MATTISON & HARAYAMA, 2001; MATTISON *et al.*, 2005). Além disso, a predação cria um gancho nutricional, porque predadores podem remineralizar nutrientes, o que, por sua vez, aumenta o crescimento bacteriano. Recentemente, segundo Ratsak *et al.* (1996), um estudo mostrou que sob limitação de nitrogênio ou fósforo, a taxa global de biodegradação pode ser aumentada em comparação com uma situação na ausência de predadores, e este não era o caso sob limitação elétron-receptor ou carbono. A estimulação da mineralização do carbono por predação também tem sido observado no meio ambiente (RATSAK *et al.*, 1996).

5 DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente os fagos, devido ao seu potencial, são reconhecidos como grandes ferramentas biológicas em várias áreas. São várias pesquisas envolvendo fagos em diversas áreas de aplicações como na terapia com função de antibiótico, controle de alimentos, biofilme e meio ambiente. Os artigos revisados neste estudo demonstraram que os fagos são úteis no controle de bactérias tanto em terapia humana como em alimentos, e também na redução de biofilmes utilizando não só fagos líticos para realizar infecção da célula hospedeira, como as endolisinas produzidas pelos fagos.

Como fago-terapia, também os bacteriófagos são projetados como ferramentas para melhorar a ação de drogas antimicrobianas, através de terapia combinada e expressão de enzimas específicas para aumentar a atividade do fármaco. No controle de bactéria que apresentam resistências a antibiótico, os fagos tem-se apresentado eficientes. Neste sentido eles conferem vantagens como antibiótico alternativo. De acordo com Hanlon *et al*, (2007), a capacidade lítica dos bacteriófagos e sua especificidade para bactérias como hospedeiras desperta atenção especial no campo de pesquisa em engenharia genética para desenvolver funções terapêuticas. Entretanto, sabe-se que esta capacidade lítica pode não ser vantajosa quanto a prognóstico do paciente em relação a fagoterapia, isto se deve ao fato de, possivelmente, liberar endotoxina no momento da lise que pode agravar o quadro clínico do paciente (MORADPOUR *et al.*, 2009).

Como controle microbiológico do ambiente e devido a capacidade lítica e persistente estimula a reciclagem intrínseca de nutrientes, pois aumenta o volume da biomassa. Com isso, aumenta nutrientes para estimular biorremediação. Neste caso a poluição por hidrocarboneto pode induzir profago que resulta na lise de uma grande proporção da comunidade bacteriana. A ação de fagos contribuiu na melhoria das técnicas empregadas para identificação da qualidade da água para o consumo humano (potabilidade da água). E o uso de bacteriófagos no controle de populações bacterianas patogênicas apresenta potencial e boa perspectiva no contexto de controle microbiológico de alimentos tendo em vista a resistência das bactérias à terapia com antibiótico.

Portanto, de modo geral, os fagos são ferramentas promissoras, mas há necessidade de desenvolver muitos estudos, uma vez que os fagos (como por exemplo, os lisadores das bactérias) podem provocar problemas na saúde humana e animal. Neste caso, por exemplo, os

mecanismos de resistência bacterianos ainda é o ponto crucial para o insucesso da fago-terapia, assim como o estudo dos mecanismos dos fagos para resistir às células hospedeiras. Sabe-se que este potencial e a capacidade lítica dos fagos pode não ser vantajosa quanto a prognóstico do paciente em relação a bacteriófago-terapia, isto se deve ao fato de, possivelmente, liberar endotoxina no momento da lise que pode agravar o quadro clínico do paciente. Em consideração a isso, é importante que se desenvolvam estudos sobre os bacteriófagos de natureza não líticos como alternativos e que proporcione segurança para a sua aplicação na terapia em humanos, no combate a infecções bacterianas. Investigações por meio de engenharia genética são ainda necessárias para modificar geneticamente bacteriófagos, no intuito de que estes possam codificar e expressar proteínas letais à bactéria patogênica hospedeira sem causar a sua lise. E pelo fato destes micro-organismos apresentarem mecanismo de ação completamente diferente de todos os antibióticos e contribuírem na redução da incidência de surtos sobre infecção bacteriana, assim como em função de agente de controle biológico é possível que as bactérias desenvolvam e se especializem para a defesa e resistência contra os bacteriófagos.

Relacionado à resistência deve-se também, considerar a transferência de genes de resistência a antibióticos para outras linhagens de hospedeiros, assim como a indução de fatores de virulência pela influência na imunidade inata quando aplicada a terapia humana e problemas ambientais como o desequilíbrio ecológico bacteriano quando utilizados no meio ambiente. E, quando se trata de uso do bacteriófagos como antibacterianos, além de se dar ênfase às características promissoras de vantagens, é importante, também, considerar outras variáveis como a quantidade e espécie de bactérias a serem combatidas, além do local onde se estabelece a infecção. No entanto a engenharia genética, no que diz respeito a bacteriófago, tem como maior desafio o biocontrole através destes micro-organismos, a transformação do sucesso dos experimentos de laboratório (da amostragem) em verdadeiros métodos que podem ser utilizados no homem e no ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMANN H W. 5500 phages examined in the electron microscope. *Arch Virol*. 2007. p.152:227–243

ACKERMANN H-W. *Tailed bacteriophages: the order Caudovirales*. *Adv. Virus Res.* 1999. p. 51:135-201.

ACKERMANN, H-W. Félix d'Hérelle, decouvreur des bacteriophages. *Les Selécion de Médecine/Sciences*. 1998. p. 8: 3-6.

ACKERMANN H-W. Bacteriophage observations and evolution. *Research in Microbiology*, v. 154, n.4. 2003. p. 245-251.

ACKERMANN, H W; DUBOW; M S. *Viruses of prokaryotes, volume I: general properties of bacteriophages*. CRC Press, Boca Raton (USA). 1987.

ACKERMANN, H W e GERSHMAN, M. Morphology of phages of a general salmonella typing set. *Research in Virology*, v. 143, p. 303-310, 1992

ACKERMANN, H W; TREMBLAY, D; MOINEAU, S. Long-term bacteriophage preservation. *WFCC Newslett*. 2004. p.38:35–40

ADAMS, M H. The stability of bacterial viruses in solutions of salts. *J Gen Physiol*. 1949. p. 32:579–594

ASHELFORD, K E, DAY, M J and FRY, J C. Elevated abundance of bacteriophage infecting bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 2003, p.69: 285-289.

ATAMER, Z; DIETICH, J; MÜLLER-MERBACH, M; NEVE, H; HELLER, K J and HINRICHS, J. (2008) Screening for and characterization of *Lactococcus lactis* bacteriophages with high thermal resistance. *Int Dairy J*. 2008. p. 19:228–235

ATTERBURY, R J; VAN BERGEN, M A; ORTIZ, F; LOVELL, M A; HARRIS, J A; De B A, WAGENAAR, J A; ALLEN, V M and BARROW, P A: Bacteriophage therapy to reduce salmonella colonization of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* 2007, p. 73: 4543-4549.

BACHRACH, G; LEIZEROVICI-ZIGMOND, M; ZLOTKIN, A; NAOR, R and STEINBERG, D. (2003) Bacteriophage isolation from human saliva. *Lett Appl Microbiol*. 2003. p. 36:50–53

BARROW, P. The use of bacteriophages for treatment and prevention of bacterial disease in animals and animal models of human infection. *J Chem Technol Biotechnol*. 2001. **76**, 677-682.

BARROW, P; LOVELL, M and Jr. BERCHIERI, A. Use of lytic bacteriophage for control of experimental *Escherichia coli* septicemia and meningitis in chickens and calves. *Clin Diagn*

Lab Immunol 1998, p.5: 294-298.

BICKLE, T. A. The ATP-dependent restriction endonucleases, p. 85-108. In S. M. Linn and R. J. Roberts (ed.), *Nucleases*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1982.

BOYER, H. W. DNA restriction and modification in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 1971. p. 25:153-176.

BRADING MG, BOYLE J, LAPPINSCOTT HM: Biofilm Formation in Laminar-Flow Using *Pseudomonas fluorescens* Ex101. *Journal of Industrial Microbiology* 1995, p.15: 297-304.

BRANCO, S. M. *Hidrobiologia Aplicada à Engenharia Ambiental*. 3. ed. São Paulo: CETESB/ASCETESB, 1986.

BREITBART, M; WEGLEY, L; LEEDS, S; SCHOENFELD, T and ROHWER, F. Phage community dynamics in hot springs. *Appl Environ Microbiol.* 2004. p. 70:1633–1640

BITTON, G. Fate of bacteriophages in water and wastewater treatment plants. In: GOYAL, S.M.; GERBA, G.P.;BITTON, G. *Phages Ecology*. New York: John Wiley & Sons, 1987. p.181-195.

BRUTTIN, A and BRUSSOW, H. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2005. p. 49: 2874-2878.

BRUYNOGUE, R; MAISIN, J. Essais de therapeutique au motern du bactériophage. *C.R.Soc Biol.* 1921;85:1120–1.

BUZRUL, S; ÖZTÜRK, P; ALPAS, H and AKCELIK, M. Thermal and chemical inactivation of lactococcal bacteriophages. *LWT.* 2007. p.40:1671–1677

CALDEIRA, J C and PEABODY, D S. Stability and assembly in vitro of bacteriophage PP7 virus-like particles. *J Nanobiotechnol.* 2007. p.5:1–10

CAROLI, G; ARMANI, G; LEVRE, E and JEFFERSON, T O. Finding of *E. coli* phage in urinary tract infections. *Ann Sclavo.* 1980. p. 22:857–860

CEBALLOS, B. S. O. *Microbiología Sanitaria y Ambiental*. In: MENDONÇA, S. R. *Sistemas de Lagunas de Estabilización - Cómo utilizar aguas residuales tratadas em sistema de regadío*. Santa Fe de Bogotá, D.C.: Mc Graw-Hill, 2000. p. 68-106. Disponível em: <http://www.unesp.br/jornal> acessado em 16/03/2012

CLARK J and MARCH, J. Bacteriophages and Biotechnology: Vaccines, gene therapy and antibacterial. *Trends in Biotechnology.* 2006, 24 (5):212-218.

COCHRAN, P. K; KELLOGG, C. A & PAUL, J. H. Prophage induction of indigenous marine lysogenic bacteria by environmental pollutants. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1998. p.164, 125–133.

COMEAU, A M; KRISCH, H M. War is peace--dispatches from the bacterial and phage killing fields. *Current opinion in microbiology* 2005;8(4):488-94.

DAVIS, C; SILVEIRA, N F A and FLEET, G H. Occurrence and properties of bacteriophages of *Leuconostoc oenos* in Australian wines. *Appl Environ Microbiol.* 1985. p. 50:872–876

DETHLEFSEN, L; ECKBURG, P.B; BIK, E.M and RELMAN, D.A. Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends Ecol Evol.* 2006. **21**: 517–523

DIAZ, E. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *INT. MICROBIOL.*, Madrid, v.7, n. 3, sept. 2004. Disponível em <http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1139-67092004000300003&lng=es&nrm=iso>. Acessado em 29 jun. 2011.

DULBECCO, R. Multiplicación y genética de bacteriófagos In: DAVIS. B; DULBECCO. R.; EISEN. N E GINSBERG. S (eds.), *Tratado de Microbiología*. 4ª ed., Ed. Masson, Barcelona, 1996. p. 760-780.

DUCKWORTH, D. History and basic properties of bacterial viruses. *Phage Ecology*. In. Goyal S M, Gerba C P, Bitton G. (Eds), pp1-44. *John Wiley & Sons*, New York. 1987

EBDON, J; MUNIESA, M and TAYLOR, H. The application of a recently isolated strain of *Bacteroides* (GB-124) to identify human sources of faecal pollution in a temperate river catchment. *Water Res.* 2007. p. **41**: 3683–3690.

ENDLICH, B., and LINN, S. M. Type I restriction enzymes, p. 137-156. In P. D. Boyer (ed.), *The enzymes*, vol. 14A. Academic Press, Inc., New York. 1981

FARRAG, S A and MARTH EH: Behavior of *Listeria monocytogenes* When Incubated Together with *Pseudomonas* Species in Tryptose Broth at 7-Degrees-C and 13- Degrees-C. *Journal of Food Protection* 1989, p.52: 536-539.

FARRAH, S.R. Ecology of phage in freshwater environments. In: GOYAL, S.M.; GERBA, G.P.; BITTON, G. *Phage Ecology*. New York: *John Wiley & Sons*, 1987. p. 125-136.

FERREIRA, D F; DANCOSTA, L J; CAVALEIRO, N P; CÂMARA, F P; e DE MIRANDA, M M F S. Propriedades Gerais dos Vírus, Estratégias de Replicação e Arquitetura dos Vírus. In SANTOS, N. S. O. *et al.* (Orgs) *Introdução à Virologia Humana*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan 2008. p. 1-41

FLAHERTY J E; JONES J B; HARBAUGH; B K; SOMODI, G C and KACKSON, L E. Control of bacterial spot on tomato in the greenhouse and field with H-mutant bacteriophages. *HortScience* 2000, p.35: 882-884.

FRENKEL, D and SOLOMON, B. Filamentous phage as vector-mediated antibody delivery to the brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002. p.99:5675–5679

GANTZER, CH; HENNY, J and SCHWARTZBROD, L. *Bacteroides fragilis* and *Escherichia coli* bacteriophages in human feces. *Int J Hyg Environ Health.* 2002. p. 205:325–328

GILL, J J; PACAN, J C; CARSON, M E; LESLIE, K E; GRIFFITHS, M W and SABOUR, P M. Efficacy and pharmacokinetics of bacteriophage therapy in treatment of subclinical

Staphylococcus aureus mastitis in lactating dairy cattle. *Antimicrob Agents Chemother* 2006, p.50: 2912-2918.

GOODE, D; ALLEN, V M; BARROW, P A. Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003, p.69: 5032-5036.

GREGORACCI, G.B.; SILVEIRA, W.D.; BROCCHI, M. The biology of bacteriophages. In: WEGRZYN, G. *Modern Bacteriophage Biology and Biotechnology*. Research Signpost (in press), 2006. 1-36p.

GUPTA, K and YIN, J. Metal recognition by in-vitro selection. *Biotechnol Bioeng*. 1995. p. 45:458

HANLON, G W. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2007. p. 30:118–128

HEAD, I M; JONES, D. M and RÖLING, W F. M. Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Reviews Microbiology*. 2006. p. 173-182

HENDRIX, R W. Bacteriophages: evolution of the majority. *Theor Popul Biol*. 2002. p.61:471–480

HUFF, W E; HUFF, GR; RATH, N C; DONOGHUE, A M: Evaluation of the influence of bacteriophage titer on the treatment of colibacillosis in broiler chickens. *Poult Sci* 2006, p.85: 1373-1377.

HURST, C J; GERBA, C P and CECH, I. Effects of environmental variables and soil characteristics on virus survival in soil. *Appl Environ Microbiol*. 1980. p. 40:1067–1079

IAWPRC *study group on health related water microbiology*. Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Water Res. Vol. 25, n°5*, 1991. p. 529-545.

IRIARTE, F B; BALOGH, B; MOMOL, M T; SMITH, L M; WILSON, M and JONES, J B. Factors affecting survival of bacteriophage on tomato leaf surfaces. *Appl Environ Microbiol* 2007, p.73: 1704-1711.

International Committee o Taxonomy of Viruses – ICTV. Disponível em <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009> acessado em 11/02/2012

JENSEN, E.C; SCHRADER, H.S; RIELAND, B; THOMPSON, T.L; LEE, K.W; NICKERSON, K.W and KOKJOHN, T.A. Prevalence of Broad-Host-Range Lytic Bacteriophages of *Sphaerotilus natans*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Envir. Microbiol*. 1998. p. 64: 575-580.

JENTSCH, S; PAWLEK, B; NOYER-WELDNER, M. GLNTHERT, U and TRAUTNER, T. A. Restriction and modification in *B. subtilis*: temperate phages SPO and 43T code for BsuR specific methyltransferase, p. 363-369. In M. Polsinelli and G. Mazza (ed.), *Transformation* 1980. Cotswold Press, Oxford. 1981

JIANG, S. C. & PAUL, J. H. Occurrence of lysogenic bacteria in marine microbial communities as determined by prophage induction. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1996. p.142, 27–38.

NOVARINO, G. *et al.* Protistan communities in aquifers: a review. *FEMS Microbiol. Rev.* 1997. p. 20, 261–275.

JOŃCZYK, E.; KŁAK, M.; MIĘDZYBRODZKI, R and GÓRSKI, A. The influence of external factors on bacteriophages—review. *Folia Microbiol.* 2011. DOI 10.1007/s12223-011-0039-8

JONES, J B; JACKSON, L E; BALOGH, B; OBRADOVIC, A; IRIARTE, F B and MOMOL, M T: Bacteriophages for plant disease control. *Annu Rev Phytopathol* 2007, p.45: 245-262.

JULIA e SARA – Bio IFES. Postado 15/02/2011. Disponível em <http://juliasarabioifes.wordpress.com/2011/02/15/13/> acessado em 18/02/2012

LASOBRAS, J; MUNIESA, M; LUCENA, F and JOFRE, J. Relationship between the morphology of bacteriophages and their persistence in the environment. *Water Sci Tech.* 1997. p. 35:129–132

LEVINE, A.J. The Bacteriophages. In: Levine, A. J. *Viruses. Scientific American Library*, 1992. p.25-45.

LEVINE, J A. *Viruses. Library of congress. Scientific American Library.* 1939

LIN, L; HONH, W; JI, X; HAN, J; HUANG, L and WEI, Y. Isolation and characterization of an extremely long tail *Thermus* bacteriophage from Tegchong hot springs in China. *J Basic Microbiol.* 2010. p. 50:452–456

LINDBERG, A.A. Bacteriophage Receptors. *Annual Reviews of Microbiology*, v. 27, p. 205-241. 1973.

LOC CARRILLO, C; ATTERBURY, R J; EL-SHIBINY, A; CONNERTON, P L; DILLON, E and SCOTT, A, Connerton IF: Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* 2005, p. 71: 6554-6563.

LÓPEZ, G. Bacteriófagos: de la biología molecular a su uso terapéutico. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias*, 2005. VIII(13):61-102.

LU, Z; BREIDT, F; PLENGVIDHYA, V and FLEMING, H P. Bacteriophage ecology in commercial sauerkraut fermentations. *Appl Environ Microbiol.* 2003. p. 69:3192–3202

LUCENA, F; RIBAS, F; DURAN, A E; SKRABER, S; GANTZER, C; CAMPOS, C; MORON, A; CALDERÓN, E and JOFRE, J. Occurrence of bacterial indicators and bacteriophages infecting enteric bacteria in ground water in different geographical areas. *J Appl Microbiol.* 2006. p. 101:96– 102

MAI, V. Dietary modification of the intestinal microbiota. *Nutr Rev.* 2004. p. **62**: 235–260.

MANN, H. The third age of phage. *Plas Biology*, 2005. 3(5):182.

MARKS T, SHARP R. Bacteriophages and biotechnology: a review. *J Chem Technol Biotechnol* 2000, p.75: 6-17.

MATHUR, M; VIDHANI, S and MEHNDIRATTA, P. Bacteriophage Therapy: An alternative to conventional antibiotics. *Journal API*. 2003. 51:593-596.

MATTISON, R. G. & HARAYAMA, S. The predatory soil flagellate *Heteromita globosa* stimulates toluene biodegradation by a *Pseudomonas* sp. *FEMS Microbiol. Lett.* 2001. p.194, 39-45.

MATTISON, R. G., TAKI, H. & HARAYAMA, S. The soil flagellate *Heteromita globosa* accelerates bacterial degradation of alkylbenzenes through grazing and acetate excretion in batch culture. *Microb. Ecol.* 2005. p. 49, 142-150.

McCLELLAND, M. The effect of sequence specific DNA methylation on restriction endonuclease cleavage. *Nucleic Acids Res.* 1981. p. 9:5859-5866.

MERRIL, C R: Bacteriophage interactions with higher organisms. *Trans N Y Acad Sci* 1974, p.36: 265-272.

MERRIL, C R; CARLTON, R M; ADHYA, S L. Exponential Biotherapies, Inc., assignee. Antibacterial therapy with bacteriophage genotypically modified to delay inactivation by the host defense system. US Patent 5,688,501, 1996.

MITCHEL, S; ROUF, M. Isolation and partial characterization of two *Aeromonas hydrophila* bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 1983. 5(45):1670-1676.

MOCÉ-LLIVINA, L; MUNIESA, M; PIMENTA-VALE, H; LUCENA, F and JOFRE, J. Survival of bacterial indicator species and bacteriophages after thermal treatment of sludge and sewage. *Appl Environ Microbiol.* 2003. p. 69:1452-1456

MODRICH, P. Studies on sequence recognition by type II restriction and modification enzymes. *Crit. Rev. Biochem.* 1982. p.13:287-323.

MODRICH, P.; ROBERTS, R. J. Type II restriction and modification enzymes, p. 109-154. In S. M. Linn and R. J. Roberts (ed.), *The nucleases*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1982

MORADPOUR, Z, *et al.* Genetically engineered phage harbouring the lethal catabolite gene activator protein gene with an inducer-independent promoter for biocontrol of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* v. 296, p.67-71, 2009.

MULLAN, W M A. Bacteriophage isolation and purification. [Online] UK. 2001. Disponível em <http://www.dairyscience.info/isolationand-purification-of-bacteriophages.html>. Acessado em 02 de fevereiro de 2012

MÜLLER-MERBACH, M; RAUSCHER, T and HINRICHS, J. Inactivation of bacteriophages by thermal and high-pressure treatment. *Int Dairy J.* 2004. p. 15:777-784

MYLON, S E; RINCIOG, C I; SCHMIDT, N and GUTIERREZ, L. Influence of salt and natural organic matter on the stability of bacteriophage MS2. *Langmuir*. doi:10.1021/la902290t. 2009

NALLELYT, S. A.; EFRÉN, H. B; OLIVER, L V. y OSCAR, T A.. Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas Bacterianas (Fagoterapia) *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, vol. 41, núm. 3, julio-septiembre, 2010, p. 17-26 Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C.. Distrito Federal, México. Disponible em: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=57916078003> acesso em 28/02/2012

NASSER, A and OMAN S. Quantitative assessment of the inactivation of pathogenic and indicator viruses in natural water sources. *Water Res.* 1999. p. 33:1748–1752

NEVE, H U; KEMPER, U, GEIS, A and HELLER J. Monitoring and characterization of lactococcal bacteriophage in a dairy plant. *Kiel Milchwirtsch Forschungsber* 1994, p.46: 167-178.

NIGUTOVÁ, K; ŠTYRIAK, I; JAVORSKÝ, P and PRISTAŠ, P. Partial characterization of *Enterococcus faecalis* Bacteriophage F4. *Folia Microbiol.* 2008. p. 53:234–236

NIKOLSKAYA, I. I; TEDIASHVILI, M. I; LOPATINA, N. G; CHANISHVIL, T. G and DEBOV, S. S.. Specificity and functions of guanine methylase of *Shigella sonnei* DDVI phage. *Biochim. Biophys. Acta.* 1979. p. 561:232-239.

NOYER-WEIDNER, M; PAWLEK, B; JENTACH, S; GUNTHER, U and TRAUTNER, T. A. Restriction and modification in *B. subtilis*: gene coding for a BsuR-specific modification methyltransferase in the temperate bacteriophage 43T. *J. Virol.* 1981. p. 38:1077-1080.

OLSON, M R; AXLER, R P and HICKS, R E. Effects of freezing and storage temperature on MS2 viability. *J Virol Meth.* 2004. p. 122:147–152

PAYÁN, A; EBDON, J; TAYLOR, H; GANTZER, C., OTTOSON, J; PAPAGEORGIOU, G.T., *et al.* Method for Isolation of *Bacteroides* bacteriophages host strains suitable for tracking sources of faecal pollution in water. *Appl Environ Microbiol.* 2005. p. **71**: 5659–5662.

PRIGENT, M; LEROY, M; CONFALONIERI, F; DUTERTRE, M and DUBOW, M S. A diversity of bacteriophages forms and genomes can be isolated from the surface sands of Sahara Desert. *Extremophiles.* 2005. p. 9:289–296

PUAPERMPOONSIRI, U.; SPENCER, J.; VAN DER WALLE, C.F. A freeze-dried formulation of bacteriophage encapsulated in biodegradable microspheres. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2009. p.72:26–33

PUIG, A; QUERALT, N; JOFRE, J and ARAUJO, R. Diversity of *Bacteroides fragilis* strains in their capacity to recover phages from human and animal wastes and from faecally polluted wastewater. *Appl Environ Microbiol.* 1999. p. **65**: 1172–1176.

RAKHUBA, D V; KOLOMIETS, E I; SZWAJCER DEY, E; and NOVIK, G I. Bacteriophage

Receptor, Mechanism of Phage Adsorption and Penetration into Host Cell. *Pol J Microbiol.* 2010;59(3):145-55. PMID: 21033576 [PubMed - indexed for MEDLINE]

RATSAK, C. H; MAARSEN, K. A. & KOOIJMAN, S. Effects of protozoa on carbon mineralization in activated sludge. *Water Res.*1996. p. **30**, 1–12.

RAYA, R R; VAREY, P; OOT, R A; DYEN, M R; CALLAWAY, T R; EDRINGTON, T S; KUTTER EM, and BRABBAN AD: Isolation and characterization of a new T-even bacteriophage, CEV1, and determination of its potential to reduce *Escherichia coli* O157:H7 levels in sheep. *Appl Environ Microbiol* 2006, p.72: 6405-6410.

REIS, M. R dos; TEXEIRA, E P; SILVEIRA, W DIAS da. Controle bacteriano de efluentes . Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio33/efluentes.pdf>> acessado em 20/06/2011.

ROBERTS, R. J. Restriction endonucleases, p. 311-340. In S. M. LINN and R. J. ROBERTS (ed.), *Nucleases*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1982.

RÖLING, W. F. M. *et al.* Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. p.68, 5537–5548.

SAJJAD, M; RAHMAN, S U; HUSSAIN, I and RASOOL, MhH. Application of Coliphage Lysate: A Preliminary Trial to Treat an Experimental *Escherichia coli* Infection in Broiler Chicken. *International Journal of Poultry Science* 2004, p.3: 538-542.

SÄWSTRÖM, CH; LISLE, J; ANESIO, A M; PRISCU, J C and LAYBOURN-PARRY, J. Bacteriophage in polar inland waters. *Extremophiles.* 2008. p.12:167–175

SERGEI, N and KONSTANTIN, S. The elusive object of Desire: Interactions of bacteriophages and their host. *Current Opinion in Microbiology.* 2008. 11(2):86-93.

SHARP, D G; HOCK, A; TAYLOR, A E; BEARD, D and BEARD, J W. Sedimentation characters and pH stability of the T2 bacteriophage of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1946. p. 165:259–270

SHENG, H; KNECHT, H J; KUDVA, I T and HOVDE, C J. Application of bacteriophages to control intestinal *Escherichia coli* O157:H7 levels in ruminants. *Appl Environ Microbiol* 2006, p.72: 5359-5366.

SILLANKORVA, S M. Utilização de Bacteriófagos no Controlo de Células Suspensas e Biofilmes de *Pseudomonas fluorescens*. 2004. [dissertação de mestrado em tecnologia do ambiente defendida no departamento de engenharia biológica na universidade do Minho]

SILLANKORVA, S; NEUBAUER, P; AZEREDO, J. *Pseudomonas fluorescens* biofilms subjected to phage phiIBB-PF7A. *BMC Biotechnology*, 2008. 8 (79), 1-12

SIMÕES M, PEREIRA M O and VIEIRA, M J: Action of a cationic surfactant on the activity and removal of bacterial biofilms formed under different flow regimes. *Water Research* 2005, p.39: 478-486.

SINGLETON, C K; WELLS, R. D; KEIN, R. D. Type II restriction enzymes, p. 157-191. In P. D. Boyer (ed.), *The enzymes*, vol. 14A. Academic Press, Inc., New York. 1981.

SMITH; H W and HUGGINS, M B. Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs. *J Gen Microbiol* 1983, p. 129: 2659-2675.

STROJ L, WEBER-DABROWSKA B, PARTYKA K, MULCZYK M, WOJCIK M: [Successful treatment with bacteriophage in purulent cerebrospinal meningitis in a newborn]. *Neurol Neurochir Pol* 1999, 33: 693-698.

STUDIER, F. W. Gene 0.3 of bacteriophage T7 acts to overcome the DNA restriction system of the host. *J. Mol. Biol.* 1975. p.94:283-295.

STUDIER, F. W., and MOVVA, N. R. SAMase gene of bacteriophage T3 is responsible for overcoming host restriction. *J. Virol.* 1976. p. 19:136-145.

SULAKVELIDZE, A; ALAVIDZE, Z; MORRIS, J G. *Bacteriophage therapy*. Antimicrob Agents Chemotherapy. 2001. **45**:649-659.

SKURNIK, M.; STRAUCH, E. Phage therapy: Facts and fiction. *International Journal of Medical Microbiology*, in press. 2005.

TARTERA, C and JOFRE, J. Bacteriophages active against *Bacteroides fragilis* in sewage-polluted waters. *Appl Environ Microbiol*. 1987. p.53:1632–1637

TEY, B T; OOI, S T; YONG, K C; TAN, N G M Y; LING, T C and TAN, W S. Production of fusion m13 phage bearing the disulphide constrained peptide sequence (C-WSFFSNI-C) that interacts with hepatitis B core antigen. *J African Biotechnol.* 2009. p. 8:268–273

THORNE, C B and HOLT, S C. Cold liability of *Bacillus cereus* bacteriophage CP-51. *J Virol.* 1974. p. 14:1006–1012

TRAUTNER, T. A; PAWLEK, B; GUNTHER, U; CANOSI, U; JENTSCH, S and FREUND, M. Restriction and modification in *B. subtilis*: identification of a gene in the temperate phage SP, coding for a BsuR specific modification methyltransferase. *Mol. Gen. Genet.* 1980. p. 180:361-367.

VIJAYAVEL, K; FUJIOKA, R; EBDON, J and TAYLOR, H. Isolation and characterization of *Bacteroides* host strain HB-73 used to detect sewage specific phages in Hawaii. *Water Res.* 2010. p. **44**: 3714–3724.

VISPO, N & PUCHADES, Y. Bacteriófagos: de la terapia con fagos a la biología combinatoria. *Biotecnología Aplicada*, 2001.18:135-147.

WAGENAAR, J A; Van BERGEN, MA; MUELLER, M A; WASSENAAR, T M and CARLTON, R M. Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers. *Vet Microbiol* 2005, 109: p. 275-283.

WARREN, J C; HATCH, M T. Survival of T3 coliphage in varied extracellular environments. I. Viability of the coliphage during storage and in aerosols. *Appl Microbiol.* 1969. Feb;17(2):256-61.

WATTANABE, R.; MATSIMOTO, T; SANO, G; ISHII, G; KAZUHIRO, T; SUMMIYAMA, J; SAKURAI, S; MATZUZAKI, S; IMAI, S; YAMAGUCHI, K. Efficacy of bacteriophages therapy against gut-derived sepsis caused by *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006. 2(51): 446-452.

WEBER-DABROSKA, B; MULCZYK, M; GÓRSKI, A. Bacteriophage therapy of bacterial infections: an update of our institute's experience. *Archivum Immunologiae Therapy Experimentals*, 2000. 48(6):547-551.

WEBFÓLIO. Disponível em:

<<http://fisioterapiamomundo.blogspot.com/2010/09/classificacao-dos-virus.html>>
acessado em 28/06/2011

WEINBAUER, M. Ecology of procaryotic viruses. *FEMS Microbiol Rev.* 2004. p.28:127-181

WELKOS, S; SCHREIBER, M; BAER, H. Identification of Salmonella with the O-1 bacteriophage. *Appl Microbiol.* 1974 Oct;28(4):618-22.

WHANG, T; DALY, B and YIN, J. Metal-ion discrimination by phage T7. *J Inorg Biochem.* 1996. p. 63:1-7

WHITMAN, P A and MARSHALL, R T. Characterization of two psychrophilic Pseudomonas bacteriophages isolated from ground beef. *Appl Microbiol.* 1971. p. 22:463-468

WICHEL, S A; BIEL, S S; GELDERBLOM, H R; BRINKHOFF, T; MUYZER, G and SCHUTT, C H. Bacteriophage diversity in the North Sea. *Appl Environ Microbiol.* 1998. p. 64:4128-4133

WICHELS, A; BIEL, S S; GELDERBLOM, H R; BRINKHOFF, T; MUYZER, G; SCHÜTT, C. Bacteriophage diversity in the North Sea. *Appl Environ Microbiol*, 1998. 64:4128-4133

WITHEY, S.; CARTMELL, E.; AVERY, L.M.; STEPHENSON, T. Bacteriophages - potential for application in wastewater treatment processes. *Science of the Total Environment*, v. 339, n. 1-3, p. 1-18, set. 2005.

YATES, M V; GERBA, C P and KELLEY, L M. Virus persistence in ground water. *Appl Environ Microbiol.* 1985. p. 31:778-781

YOON, S S; BARRANGOU-POUEYS, R; BREIDT, F J R; KLAENHAMMER, T R and FLEMING, H P. (2002) Isolation and characterization of bacteriophages from fermenting sauerkraut. *Appl Environ Microbiol.* 2002. p. 68:973-976

YUAN, R. Structure and mechanism of multifunctional restriction endonucleases. *Annu. Rev. Biochem.*1981. p. 50:285-315.

ZOETENDAL, E.G; COLLIER, C.T; KOIKE, S; MACKIE, R.I and GASKINS, H.R. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *J Nutr.* 2004. p. **134**: 465–472.

ZOON, K C; HABERSAT, M; SCOCCA, J J. Synthesis of envelope polypeptides by *Haemophilus influenzae* during development of competence for genetic transformation. *J Bacteriol.* 1976. 127:545-554.

KAMEYAMA, L; FERNANDEZ, L; BERMUDEZ, R M; GARCIA-MENA, J; ISHIDA, C; GUARUEROS, G. Properties of a new coliphage group from human intestinal flora. *Rec Res Develop Virol.* 2001. p.3:297–303

KELLER, R and TRAUB, N. The characterization of *Bacteroides fragilis* bacteriophage recovered from animal sera: observations on the nature of bacteriophage carrier cultures. *J Gen Virol.* 1974. p. 24:179–189

KERBY, G P; GODWY, R A; DILLON, E S; DILLON, M L; CSÁKY, T Z; SHARP, D G and BEARD, J W. Purification, pH stability and sedimentation properties of the T7 bacteriophage of *Escherichia coli*. *J Immunol.* 1949. p. 63:93–107

KINNER, N. E; HARVEY, R. W; SHAY, D. M; METGE, D. W. & WARREN, A. Field evidence for a protistan role in an organically-contaminated aquifer. *Environ. Sci. Technol.* 2002. p. 36, 4312–4318.

KOTA, S; BORDEN, R. C. & BARLAZ, M. A. Influence of protozoan grazing on contaminant biodegradation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 1999. p. **29**, 179–189.

KRIGER, D. H and SCHROEDER, C. Bacteriophage T3 and bacteriophage T7 virus-host cell interactions. *Microbiol. Rev.* 1981. p.45:9-51.

KRIGER, D. H; SCHROEDER, C; HANSEN, S and ROSENTHAL, H. A. Active protection by bacteriophages T3 and T7 against *E. coli* B- and K-specific restriction of their DNA. *Mol. Gen. Genet.* 1977. p. 153:99-106.

KORNBERG, A. DNA Replication. In.W. H. Freeman. San Francisco. 1980

KRUGER, D H. e BICKLE, T A. Bacteriophage Survival: Multiple Mechanisms for Avoiding the Deoxyribonucleic Acid Restriction Systems of Their Hosts. *MICROBIOLOGICAL REVIEWS*, Sept. American Society for Microbiology Vol. 47, n. 3, 1983, p. 345-360

KUMARI, S; HARJAI, K and CHIBBER S. Isolation and characterization of *Klebsiella pneumoniae* specific bacteriophages from sewage samples. *Folia Microbiol.* 2010. p. 55:221–227

KUO, T T; CHOW, T Y; LIN, Y T and YANG, C M. Specific dissociation of phage Xp12 by sodium citrate. *J Gen Virol.* 1971. p. 10:199–202