

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Gustavo Bueno Gregoracci

“LEVANTAMENTO DE BACTERÍOFAGOS LÍTICOS:
ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE VÍRUS PROVENIENTES DE
ESGOTO COMUM COM POTENCIAL APLICAÇÃO ANTIMICROBIANA”

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do Título de Mestre em
Genética e Biologia Molecular na área de
Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Brocchi

Campinas
2006

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	G861v
V	EX
TOM	BC/ 69798
PROC	16.123.06
C	☐
D	☒
PREÇO	11.00
DATA	30-8-06

Bib ID 386336

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

G861v

Gregoracci, Gustavo Bueno

Levantamento de bacteriófagos líticos: isolamento e caracterização de vírus provenientes de esgoto comum com potencial aplicação antimicrobiana / Gustavo Bueno Gregoracci . -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Marcelo Brocchi.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Bacteriófago. 2. Vírus - Isolamento. 3. Caracterização biológica. I. Brocchi, Marcelo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Survey of lytic bacteriophages: isolation and characterization of viruses proceeding from raw sewage with potential antimicrobial application.

Palavras-chave em inglês: Bacteriophages; Viruses – Isolation; Biological characterization.

Área de concentração: Microbiologia.

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.

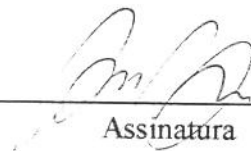
Banca examinadora: Marcelo Brocchi, Clarice Weis Arns, Eurico de Arruda Neto.

Data da defesa: 17/02/2006.

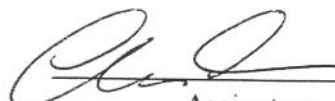
Campinas, 17 de fevereiro de 2006.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Marcelo Brocchi


Assinatura

Profª. Dra. Clarice Weis Arns


Assinatura

Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto

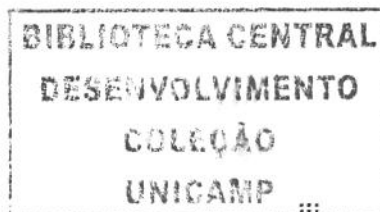

Assinatura

Prof. Dr. Domingos da Silva Leite

Assinatura

Prof. Dr. Laurimar Fiorentin

Assinatura



“Nos desculpamos pelo inconveniente”
– Douglas Adams, “Até mais e Obrigado pelos Peixes”

Dedicatória

*Dedico este trabalho a meus pais e irmãos,
Pelo apoio e incentivo durante todo este projeto
E pela paciência com minhas viagens constantes e mudanças.*

Reconhecimento especial

*Agradeço especialmente ao meu orientador Marcelo,
Primeiro, pela oportunidade de me dedicar a este campo de estudo
E claro, pelos conselhos e conversas,
sem os quais o trabalho não teria sido concluído.*

Muito Obrigado!!

Agradecimentos

- Primeiro a Murphy, pelo abandono da co-autoria do projeto, e por permitir que meus experimentos dessem certo mesmo que no finzinho.... ☺
- À Débora e à Daniele, pela ajuda no final do projeto com experimentos e pela companhia no começo deste ano. Muito obrigado, meninas!!
- Aos meus amigos no laboratório em Ribeirão, André F., André P., Bela, Gustavo, Juliana, Liandra, Lucinda, Ita, Rosana e Zé, pelas conversas, risadas e happy hours... Muitas boas lembranças....
- Aos meus amigos da Molar, Smoo, Doidinho, Marcelo e até o Wimbe... Foi uma ótima experiência conviver com vocês!!!
- Aos meus novos amigos do laboratório em Campinas, Alline, André F. (de novo), Elisa, Guilherme, Bruna, Tati, Gérson e Mário. A mudança de laboratório (e cidade) teria sido muito difícil sem o apoio de vcs...
- À minha nova “família” em Campinas, Alex, André (de novo!), Carla, Fernanda, Juan, Lígia, Lúcia, Maya, Pablo, Vanessa, Willy, pelos bons momentos na república... Espero continuar com vcs pelos próximos anos.....
- Aos funcionários da USP que me auxiliaram com os primeiros experimentos, Cirley, Tuca, Zé Augusto e Marly. Aprendi bastante com vcs!!!
- Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Depto de Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos, da FMRP-USP, pela colaboração com a padronização dos protocolos e primeiros testes experimentais...
- Aos funcionários da Unicamp, que me ajudaram muito no fim dos experimentos, Elzira, Márcio, Evandro, Antônia, Ana e Sandra. Sua ajuda foi essencial agora no final do projeto...
- Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da Unicamp, pela colaboração com experimentos finais e análise de amostras!!
- Aos meus amigos do RPG de São Carlos, todos. Pelos momentos de entretenimento, dos quais não consigo mais me abster.... ☺ Vamos chegar a níveis épicos, hein!!

Índice Geral

Índice de Figuras e Tabelas.....	x
Lista de Abreviaturas.....	xi
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiii
1. Introdução.....	01
1.1. Abundância e diversidade viral.....	01
1.2. Bacteriófagos em ecologia e evolução.....	04
1.3. Conhecimento atual sobre bacteriófagos.....	10
1.4. Bacteriófagos como agentes terapêuticos.....	15
2. Objetivos.....	21
3. Material e Métodos.....	22
3.1. Linhagens bacterianas.....	22
3.2. Cultivo bacteriano.....	22
3.3. Isolamento de bacteriófagos de amostras líquidas.....	23
3.4. Plaqueamento de bacteriófagos.....	23
3.5. Propagação de bacteriófagos.....	24
3.6. Titulação de bacteriófagos.....	25
3.7. Avaliação da especificidade de hospedeiros.....	26
3.8. Purificação preliminar de bacteriófagos.....	26
3.9. Análise morfológica por Microscopia Eletrônica.....	26
3.10. Determinação do ácido nucléico viral.....	27
3.10.1. Extração rápida de DNA.....	27
3.10.2. Eletroforese.....	27
3.10.3. Extração de DNA com fenol.....	27
3.10.4. Digestões enzimáticas.....	27
3.11. Atividade biológica <i>in vitro</i> do fago Shfl1.....	28

3.11.1. Ensaio da atividade bactericida em cultura de células HeLa.....	28
3.11.2. Ensaio da atividade bactericida em ambiente complexo.....	28
4. Resultados e Discussão.....	30
4.1. Metodologias de isolamento e caracterização de bacteriófagos líticos.....	30
4.2. Bacteriófagos líticos isolados.....	34
4.3. Testes de atividade biológica.....	43
5. Conclusões.....	47
6. Referências Bibliográficas.....	48

Índice de Figuras e Tabelas

Tabela I – Gama de hospedeiros dos bacteriófagos estudados.....	35
Figura 1 – Imagens digitalizadas dos negativos de microscopia eletrônica de transmissão; bacteriófagos com cauda contrátil, corados negativamente com acetato de uranila 2% (pH4,5)..	38
Figura 2 – Imagens digitalizadas dos negativos de microscopia eletrônica de transmissão; bacteriófagos com cauda longa não-contrátil, corados negativamente com acetato de uranila 2% (pH 4,5).....	39
Figura 3 – Imagens digitalizadas dos negativos de microscopia eletrônica de transmissão; bacteriófagos com cauda curta, corados negativamente com acetato de uranila 2% (pH 4,5).....	39
Figura 4 – Genomas de bacteriófagos extraídos pelo protocolo rápido.....	40
Figura 5 – Digestão enzimática, com DNase e nuclease S1, dos genomas virais extraídos pela técnica de extração com fenol.....	41
Tabela II – Proposta de classificação taxonômica dos bacteriófagos.....	42
Figura 6 – Gráfico do ensaio de atividade bactericida do bacteriófago Shfl1 em cultura de células HeLa infectadas com <i>S. flexneri</i>	44
Figura 7 – Gráfico do ensaio de atividade bactericida do bacteriófago Shfl1 em água de esgoto enriquecida com <i>S. flexneri</i>	46

Lista de Abreviaturas

BHI – Infusão Cérebro-Coração

CFU – Unidade formadora de colônias

DAERP – Departamento de Água e Esgoto de Ribeirão Preto

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DOM – Matéria orgânica dissolvida

FBS – soro bovino fetal

h – horas

Hoc – Proteína externa do capsídeo altamente imunogênica

LB – Caldo de Luria

MEM – meio mínimo essencial

min –minutos

NaCl – Cloreto de Sódio

PEG – Polietilenoglicol

PFU –Unidade formadora de placas

PTA – Ácido fosfotungstênico

RNA – Ácido ribonucléico

SM – Tampão de diluição de fagos

T – tempo

UA – Acetato de uranila

Resumo

Os bacteriófagos, vírus que infectam procariotos, são as entidades biológicas mais numerosas do globo. Sua abundância desencadeou revisões em diversos campos como genética, evolução e ecologia, e os fagos atualmente são reconhecidos como importantes vetores para o fluxo de matéria, energia e informação em ambientes naturais. Contudo, há uma enorme diferença entre a quantidade de bacteriófagos estimada no globo (mais de 10^{30} partículas virais) e a quantidade descrita na literatura (em torno de 5300 amostras). Esta amostragem restrita reflete complicações para estudos de diversidade viral e demonstra as limitações de nosso conhecimento sobre estes vírus. Além disso, a emergência de bactérias resistentes a múltiplos antibióticos implica em uma necessidade de novas práticas terapêuticas, e os fagos representam uma alternativa digna de estudos aprofundados.

Assim sendo, este trabalho objetivou o isolamento, a partir de esgoto, e a caracterização biológica de bacteriófagos líticos contra patógenos humanos, visando ampliar a amostragem destes vírus e selecionar novos possíveis agentes terapêuticos. A caracterização envolveu análises morfológica, genética e de especificidade de hospedeiros.

As metodologias adaptadas de isolamento e caracterização permitiram a análise de mais de 20 bacteriófagos, todos pertencentes à ordem *Caudovirales*, bem como de uma proposição para a classificação taxonômica dos isolados. Merece destaque especial o isolamento de três fagos contra *Chromobacterium violaceum*, feito inédito na literatura, bem como estudos sobre a suscetibilidade deste organismo a diversos bacteriófagos isolados. Por fim, ensaios biológicos sugerem estudos posteriores sobre a aplicação de um destes fagos, denominado Shfl1, para a terapia de *Shigella flexneri* em infecções humanas, mas são incertos quanto ao potencial do mesmo para contenção deste patógeno no processamento de esgoto comum.

Abstract

Bacteriophages, viruses that infect prokaryotic hosts, are the most numerous biological entities of the world. Their abundance implied in reviews in several areas of knowledge, like genetics, evolution and ecology, and phages are now recognized as important vectors in the flux of matter, energy and information in natural environments. However, there is a huge difference between the estimated number of bacteriophages in the world (more than 10^{30} viral particles) and the quantity described in the literature (around 5300 samples). This restricted sampling reflects in complications to studies of viral diversity and demonstrates our limited knowledge regarding these viruses. Furthermore, the emergence of bacteria resistant to multiple antibiotics implies in a need for new therapeutical approaches, and phages represent an alternative worthy of additional studies.

As being so, our purpose in this study was to isolate, from raw sewage, and to biologically characterize lytic bacteriophages, intending to extend these viruses' sampling and to select possible new therapeutic agents. Characterization involved morphological, genetic and host range analysis.

The adapted protocols for isolation and characterization permitted the analysis of more than 20 bacteriophages, all belonging to the *Caudovirales* order, as well as a tentative taxonomic classification of the samples. Other distinctive results include the isolation of three bacteriophages against *Chromobacterium violaceum*, previously unknown in the literature, as well as the study about the susceptibility of this organism to several isolated phages. Moreover, biological assays suggested further studies about the application of one of these phages, named Shfl1, in the treatment of *Shigella flexneri* infections in humans, but were uncertain about the potential of the same virus to restrain this pathogen during sewage processing.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Abundância e diversidade viral

Os vírus são sistemas biológicos elementares que possuem algumas propriedades de sistemas vivos, como presença de genes, capacidade de replicação e evolução, bem como adaptação a hospedeiros particulares, habitats bióticos e nichos ecológicos. No entanto, não são considerados seres vivos, pois não capturam e armazenam energia e não são funcionalmente ativos fora das células hospedeiras (van Regenmortel e Mahy, 2004). A percepção popular de vírus em geral é associada estritamente a termos como “doença”, “prejuízo econômico”, “parasita”, entre outros. Mesmo em publicações científicas destinadas a amplas áreas como taxonomia viral (van Regenmortel e Mahy, 2004), é possível encontrar definições generalistas de vírus como “patógenos” e “objetos causadores de doenças”. Essa perspectiva decorre da relevância de certos hospedeiros em relação a outros. Patógenos humanos e patógenos de animais e plantas de interesse econômico recebem muito mais estudos do que vírus que infectam outros organismos (van Regenmortel e Mahy, 2004). Esse enfoque dos estudos reflete na percepção geral, leiga e mesmo acadêmica, sobre estas entidades biológicas.

Sob uma perspectiva ecológica, tal percepção não é a mais apropriada e, felizmente, vem sofrendo algumas alterações conceituais. Certos campos de conhecimento passaram por revisões teóricas um tanto recentes, e atualmente reconhecem os vírus como importantes personagens em temas de áreas diversas como ecologia, evolução e genética (Fuhrman, 1999, Breitbart *et al.*, 2002, Canchaya *et al.*, 2003, Breitbart *et al.*, 2004, Chibani-Chennoufi, 2004, Weinbauer, 2004, Weinbauer e Rassoulzadegan, 2004, Breitbart e Rohwer, 2005, Filée, 2005, Hambly e Suttle, 2005, Suttle, 2005, Gregoracci *et al.*, 2006).

A principal observação experimental que desencadeou toda essa mudança possivelmente foi a percepção da abundância dos vírus em todos os ambientes permissíveis a vida, em escala superior mesmo aos procariotos, reconhecidos ocupantes de todos esses nichos (Bamford, 2003, Chibani-Chennoufi, 2004, Weinbauer e Rassoulzadegan, 2004, Breitbart e Rohwer, 2005, Dabrowska *et al.*, 2005a,b, Hambly e Suttle, 2005, Skurnik e Strauch, 2005, Suttle, 2005). Atualmente considera-se a viriosfera, ou o espaço onde os vírus se relacionam com seus hospedeiros na Terra, como englobando todos os ambientes estudados permissíveis a vida (Bamford, 2003, Gorski e Weber-Dabrowska, 2005, Hambly

e Suttle, 2005, Suttle, 2005). Genomas virais já foram isolados de ambientes distintos, incluindo águas profundas, salternas solares (salinidade dez vezes superior aos oceanos), fontes quentes ácidas ($>80^{\circ}\text{C}$ com $\text{pH}=3,0$), lagos alcalinos ($\text{pH}=10$), lagos polares ($>30\text{m}$ de profundidade) e ambientes subterrâneos terrestres ($>2\text{km}$ de profundidade) (Breitbart e Rohwer, 2005). É também interessante ressaltar que, além de envolver os seres vivos em provavelmente todos os locais por esses ocupados, os vírus também participam da composição de genomas celulares. A grande maioria dos genomas procariotos seqüenciados possuem genes claramente relacionados com vírus (Bamford, 2003, Brüssow *et al.*, 2004, Daubin e Ochman, 2004, Weinbauer e Rassoulzadegan, 2004, Casjens, 2005), e elementos remanescentes de infecções virais são constituintes significantes de seqüências repetitivas de genomas de organismos superiores (Bamford, 2003, Bannert e Kurth, 2004), indicando uma contribuição dos vírus na evolução da maioria dos seres vivos.

Os principais componentes dessa virosfera são os bacteriófagos, vírus que infectam organismos procariotos, simplesmente por seus hospedeiros serem os únicos com distribuição e abundância suficientes para sustentar esta enorme quantidade de vírus no planeta (Fuhrman, 1999, Breitbart *et al.*, 2002, Breitbart e Rohwer, 2005, Hambly e Suttle, 2005). Bacteriófago, ou fago, é um termo geral que engloba todos os vírus que infectam hospedeiros pertencentes aos domínios *Archaea* e *Eubacteria* (Ackermann, 2003, Gregoracci *et al.*, 2006). Estes domínios comportam a maioria absoluta de organismos terrestres em termos de biomassa, e estimativas do total de procariotos no planeta giram em torno de 10^{30} organismos (Chibani-Chennoufi, 2004, Suttle, 2005). Observações diretas e indiretas de microorganismos em diversos ambientes distintos reportam cerca de dez partículas virais para cada célula (Breitbart *et al.*, 2004, Chibani-Chennoufi, 2004, Weinbauer e Rassoulzadegan, 2004, Breitbart e Rohwer, 2005, Skurnik e Strauch, 2005). Sendo assim, as estimativas do total de vírus no globo atingem cerca de 10^{31} partículas (Pedulla *et al.*, 2003, Brüssow *et al.*, 2004, Chibani-Chennoufi, 2004, Dabrowska *et al.*, 2005b, Filée, 2005, Suttle, 2005, Gregoracci *et al.*, 2006). A imponência deste número promoveu diversos estudos que culminaram nas revisões de conceitos mencionadas anteriormente e que serão discutidas na próxima seção. No entanto, a quantidade de bacteriófagos caracterizada atualmente, descrita na literatura, representa uma amostragem risível deste total, atingindo pouco mais de 5300 amostras (Ackermann, 2003, Dabrowska

et al., 2005b, Gregoracci *et al.*, 2006). É interessante notar que enormes revisões conceituais foram realizadas mesmo sem estudos detalhados a respeito destas entidades biológicas. Merece destaque adicional o fato da maioria dos fagos caracterizados até o momento representarem uma amostragem restrita de vírus que infectam hospedeiros específicos e, em diversos casos, altamente relacionados.

Um outro tópico, abordando a diversidade de bacteriófagos, apresenta resultados mais controversos ainda. Certas famílias de fagos são capazes de infectar grupos bastante distintos de procariotos, sugerindo uma origem comum antiga destes vírus, em torno da separação entre os três domínios da vida, remontando a bilhões de anos atrás (Ackermann, 2003, Pedulla *et al.*, 2003, Weinbauer e Rassoulzadegan, 2004, Hambly e Suttle, 2005). Portanto, os bacteriófagos são possivelmente os primeiros vírus que existiram na Terra e sua presença na atualidade implica em sobrevivência a pressões seletivas por um período de tempo extremamente extenso. Uma das explicações para tal sobrevivência seria uma diversidade viral impressionante, equiparando-se ou mesmo superando a dos seus hospedeiros procariotos (Weinbauer, 2004, Filée, 2005, Gregoracci *et al.*, 2006). Os estudos de diversidade de fagos, no entanto, são dificultados pela incapacidade de cultivo da maioria dos procariotos do ambiente (menos de 1% dos procariotos podem ser cultivados em placas) (Breitbart *et al.*, 2002, Weinbauer, 2004, Weinbauer e Rassoulzadegan, 2004, Breitbart e Rohwer, 2005, Gregoracci *et al.*, 2006). Estudos de vírus necessitam do cultivo de hospedeiros e os bacteriófagos também obedecem esta restrição. Ainda assim, técnicas independentes de cultivo têm revelado uma impressionante diversidade viral ainda não caracterizada (Breitbart *et al.*, 2002, Chibani-Chennoufi, 2004, Breitbart e Rohwer, 2005, Hambly e Suttle, 2005). Estudos de metagenômica viral, ou seja, a análise funcional baseada em seqüências de genomas virais contidos em amostras ambientais, observaram em média, em torno de 75% de seqüências sem alinhamento nos bancos de dados existentes (E-value >0,001 no banco GenBank não-redundante) (Breitbart e Rohwer, 2005, Hambly e Suttle, 2005). Dada a ubiquidade dos fagos e abundância de procariotos nos ambientes submetidos às análises metagenômicas (fezes humanas e animais, ambientes terrestres e aquáticos) é provável que a maioria das seqüências representa genomas de bacteriófagos, corroborando a suposta diversidade destes vírus. Para exemplificar esta diversidade, estima-se, com base em modelos matemáticos, que existe

mais diversidade viral em 1kg de sedimentos marinhos superficiais, perto da costa, do que existe de répteis em todo o planeta (Breitbart e Rohwer, 2005).

Outro fator complicante em estudos sobre diversidade em vírus é a ausência de um marcador universal (Weinbauer e Rassoulzadegan, 2004, Breitbart e Rohwer, 2005, Filée, 2005, Hambly e Suttle, 2005, Suttle, 2005). A natureza genética de fagos (discutida posteriormente) impossibilita a existência de um gene difundido em todas as partículas virais. A utilização de marcadores grupo-específicos, no entanto, forneceu evidências tanto da diversidade como de movimento entre biomas, que reduziriam a diversidade global (Breitbart e Rohwer, 2005, Filée, 2005). Utilizando duas seqüências conservadas do capsídeo (g23) de fagos T4-like como marcadores, Filée *et al.* (2005) obtiveram evidências da existência destes fagos em ambientes diversos, como o Golfo do México (110m de profundidade), mar Ártico em Chuckchi (3.246m de profundidade), águas superficiais do oceano Ártico e vários fiordes e baías ao longo da costa da Columbia Britânica. Com apenas 8 amostragens diferentes, os autores expandiram a classificação deste agrupamento de fagos, criando mais cinco grupos diferentes dos quatro descritos na literatura. Por outro lado, Breitbart *et al.* (2004), utilizando seqüências de polimerase específicas de podovírus T7-like, observaram seqüências quase idênticas em ambientes distintos (marinhos, de água doce, fontes termais, sedimentos, terrestres, extremos, associados a corais, fezes humanas e rúmen). A menos que algum fago completamente desconhecido e não caracterizado contenha seqüências relacionadas, as evidências sugerem movimento entre biomas destes genes, e/ou dos fagos T7-like cujos genomas os contém, em tempo evolucionário muito recente (Breitbart *et al.*, 2004, Breitbart e Rohwer, 2005). Isso significa que a biodiversidade viral seria menor do que as evidências iniciais sustentaram, ainda que a diversidade permaneça elevada localmente nos biomas (Breitbart e Rohwer, 2005, Suttle, 2005). Ainda assim, permanece o paradigma de que apenas começamos a vislumbrar a real dimensão da diversidade viral, e estudos envolvendo bacteriófagos serão essenciais para ampliar essa dimensão do conhecimento científico (Filée, 2005).

1.2. Bacteriófagos em ecologia e evolução

Conforme mencionado na seção anterior, algumas mudanças de perspectiva em relação a vírus foram efetuadas, ainda que sutilmente, em diversas áreas de conhecimento, com destaque especial para ecologia e evolução.

No campo da ecologia, antes da percepção da abundância dos vírus em ambientes naturais, estes eram considerados transeuntes inocentes em cadeias ecológicas, incapazes de influenciar processos de maneira pronunciada. Essa mudança de percepção demandou uma revisão conceitual importante, tal que os vírus, principalmente os fagos, hoje ocupam lugar de destaque em relação à transferência de informação, matéria e energia em ambientes naturais (Weinbauer e Rassoulzadegan, 2004, Hambly e Suttle, 2005, Suttle, 2005).

Desde a descoberta da abundância de procariotos no ambiente, estudos visaram entender as relações de predação envolvendo estes organismos (Breitbart e Rohwer, 2005, Suttle, 2005). Logo foi constatada a presença de protistas, principalmente nanoflagelados heterotróficos, como predadores de procariotos, através da chamada “pastagem” de microorganismos (Fuhrman, 1999, Weinbauer, 2004, Breitbart e Rohwer, 2005). Após consumirem os procariotos estes protistas são consumidos por organismos maiores e assim sucessivamente até as formas de vida macroscópicas (Weinbauer, 2004). Os vírus foram incluídos no processo apenas recentemente, e em certos nichos observou-se que a predação por fagos líticos representa a principal causa da mortalidade de bactérias (Fuhrman, 1999, Suttle, 2005, Gregoracci *et al.*, 2006). Atualmente, considera-se que ambos, nanoflagelados e fagos, sejam os principais predadores de bactérias em ambientes aquáticos, com destaque para um ou outro em nichos específicos. As consequências dessa predação diferencial influenciam drasticamente a cadeia alimentar microscópica. A predação por protistas seqüestra os nutrientes, transferindo-os para níveis tróficos superiores, enquanto a lise viral libera esses nutrientes para a reserva de “matéria orgânica dissolvida” (DOM), disponibilizando-os para os demais procariotos (Fuhrman, 1999, Weinbauer, 2004, Gregoracci *et al.*, 2006). Isso permite a utilização de boa parte da biomassa bacteriana por organismos similares, formando um “loop” viral semifechado de nutrientes (Fuhrman, 1999, Weinbauer, 2004). Considerando a origem antiga dos vírus, é possível supor que os vírus representaram, e ainda representem, a principal causa de mortalidade de organismos procarióticos, e talvez estejamos menosprezando a contribuição atual dos vírus neste campo (Weinbauer e Rassoulzadegan, 2004, Hambly e Suttle, 2005).

Ademais, os fagos são tidos como importantes reguladores da disponibilidade de nutrientes. Eles favorecem a formação de agregados particulados lisando células e liberando restos celulares. Esses são constituídos por moléculas dissolvidas (polímeros,

oligômeros e monômeros), colóides e fragmentos celulares (Fuhrman, 1999, Weinbauer, 2004, Gregoracci *et al.*, 2006). As propriedades físico-químicas destes produtos liberados supostamente podem influenciar a fluidez local, promovendo a formação de agregados, que precipitam material na coluna de água (Fuhrman, 1999, Weinbauer, 2004, Gregoracci *et al.*, 2006). Além disso, os agregados concentram nutrientes e atraem microorganismos, constituindo “hotspots” de atividade microbiana, albergando organismos metabolicamente mais ativos (Weinbauer e Rassoulzadegan, 2004). Essa concentração de procariotos, por outro lado, amplia as chances de encontro aleatório com fagos, facilitando a infecção (Fuhrman, 1999, Weinbauer, 2004, Weinbauer e Rassoulzadegan, 2004). A lise destes organismos constituintes de agregados particulados pode favorecer a dissolução dos agregados e liberação local de nutrientes (Fuhrman, 1999, Weinbauer, 2004, Gregoracci *et al.*, 2006). Em teoria, a liberação de nutrientes favorece a respiração e a multiplicação bacterianas, beneficiando as populações locais (Fuhrman, 1999, Weinbauer, 2004).

As populações virais são ubíquas, abundantes e temporalmente dinâmicas em ambientes aquáticos, e possivelmente em ambientes terrestres também (Fuhrman, 1999, Chibani-Chennoufi, 2004, Breitbart e Rohwer, 2005). Conforme mencionado anteriormente, os fagos representam a maioria absoluta dessas populações e sustenta-se que sejam, de um modo geral, responsáveis pela mortalidade diária de um terço dos procariotos do globo (Suttle, 2005). A abundância e ubiquidade desses vírus também permitem inferir uma alta taxa de decaimento viral, e portanto uma taxa considerável de “turnover” de fagos emerge dessa combinação, a fim de manter a população numerosa observada (Fuhrman, 1999, Pedulla *et al.*, 2003, Weinbauer, 2004, Breitbart e Rohwer, 2005). Esse “turnover” constante promove uma ciclagem impressionante de nutrientes, cujo papel também foi reconhecido recentemente (Fuhrman, 1999, Weinbauer, 2004, Suttle, 2005, Gregoracci *et al.*, 2006). Os fagos influenciam os ciclos biológicos de diversos nutrientes orgânicos essenciais, incluindo carbono, nitrogênio, fósforo e ferro, presentes em quantidades limitantes na maioria dos ambientes naturais. A liberação viral estimada de ferro, por exemplo, é suficiente para sustentar a maior parte das necessidades de outros organismos no ambiente (Suttle, 2005). É importante ressaltar também que todos esses nutrientes liberados encontram-se agregados a matéria orgânica, o que facilita o processamento dos mesmos por organismos vivos.

Além da liberação de nutrientes e todas as consequências decorrentes desta, os fagos supostamente também são responsáveis pela promoção da diversidade microbiana (Fuhrman, 1999, Weinbauer e Rassoulzadegan, 2004). Os vírus são considerados agentes de seleção natural para diversos organismos e tal influência é deveras pronunciada em populações unicelulares microbianas (Levin *et al.*, 1999, Bamford, 2003, Comeau e Krisch, 2005). Mesmo em biomas onde a lise por fagos não é tão pronunciada, os vírus ainda podem influenciar profundamente as proporções relativas de diferentes espécies ou linhagens na comunidade (Fuhrman, 1999, Weinbauer e Rassoulzadegan, 2004). Um dos primeiros modelos propostos, e ainda vigente, foi o “kill the winner”, onde os fagos líticos conteriam as espécies mais favorecidas competitivamente e permitiriam a manutenção de linhagens desfavorecidas, promovendo a diversidade. Esse modelo foi postulado com base na maior probabilidade de encontros aleatórios de fagos com hospedeiros mais abundantes no meio (Fuhrman, 1999, Weinbauer, 2004, Weinbauer e Rassoulzadegan, 2004, Breitbart e Rohwer, 2005, Gregoracci *et al.*, 2006). Bacteriófagos, como outros vírus, não possuem estruturas próprias de locomoção e dependem de difusão passiva, movimentos Brownianos em líquidos e/ou deslocamento de seus hospedeiros para conseguir o contato inicial necessário para uma infecção (Fuhrman, 1999, Weinbauer, 2004, Gregoracci *et al.*, 2006). Hospedeiros mais abundantes amplificariam os vírus e seriam contidos, em uma espécie de controle biológico natural. Esse mecanismo supostamente explica o colapso das epidemias periódicas de cólera na Índia (Faruque *et al.*, 2005). A natureza autolimitante dessas epidemias seria atribuída à amplificação de respectivos fagos líticos, no ambiente e principalmente *in vivo* nos intestinos humanos, aumentando a carga viral e reduzindo a carga ambiental de *Vibrio cholerae*. Esse modelo também é suportado pela observação experimental do aumento de fagos nativos, após um florescimento de *Vibrio natriegens*, concomitante com o colapso desse florescimento (Weinbauer e Rassoulzadegan, 2004). Outros experimentos com incubação de amostras marinhas, com ou sem vírus, também revelam mudanças em abundância, taxas de crescimento e principalmente na composição das populações bacterianas estudadas (Weinbauer e Rassoulzadegan, 2004).

Fagos também podem influenciar a diversificação bacteriana sem envolver lise direta. Fagos lisogênicos integram seu material genético ao de seus hospedeiros, sendo replicados passivamente junto com os genomas destes (Chibani-Chennoufi, 2004,

Weinbauer e Rassoulzadegan, 2004). Os detalhes sobre os ciclos replicativos dos fagos serão discutidos na próxima seção. A consequência mais imediata de um evento de lisogenia é a imunidade a fagos relacionados, decorrente dos mecanismos de manutenção da inserção. Essa imunidade a infecções pode favorecer bastante certas espécies no ambiente e, de fato, em certos locais como águas profundas no mar Mediterrâneo, foi observado que a maior parte do bacterioplâncton possui lisógenos (Weinbauer e Rassoulzadegan, 2004). Fagos lisogênicos também podem transduzir genes para seus hospedeiros. Estes genes podem alterar características metabólicas, morfológicas e/ou fisiológicas das bactérias, podendo conferir vantagens ou desvantagens competitivas, e mesmo permitir a adaptação a novos nichos ecológicos, incluindo organismos superiores (Brüssow *et al.*, 2004, Chibani-Chennoufi, 2004, Daubin e Ochman, 2004, Weinbauer e Rassoulzadegan, 2004, Casjens, 2005, Faruque *et al.*, 2005).

A transdução por fagos é outro tópico que passou por reavaliações recentemente. A abundância de fagos em ambientes naturais, associada ao enorme volume do oceano, considerando tempos de geração de um dia, implica na ocorrência de eventos genéticos, mesmo muito raros (10^{-20}), milhões de vezes por dia no planeta (Fuhrman, 1999, Gregoracci *et al.*, 2006). Contudo, as evidências de transdução em ambientes naturais são poucas e também controversas. Algumas evidências conservadoras apontam para baixas frequências naturais de transdução, enquanto outros estudos reportaram frequências bem altas mesmo entre fagos marinhos e enterobactérias não-marinhas (Weinbauer e Rassoulzadegan, 2004). As abordagens clássicas apontavam para gamas restritas de hospedeiros que limitariam a movimentação lateral de genes entre fagos e bactérias (Fuhrman, 1999, Weinbauer e Rassoulzadegan, 2004). Recentemente, este conceito de especificidade tem recebido críticas e observou-se considerável variação da permissividade de hospedeiros a fagos em diversos ambientes (Chibani-Chennoufi, 2004, Weinbauer e Rassoulzadegan, 2004, Skurnik e Strauch, 2005). Se confirmadas, essas últimas observações implicariam em novas mudanças conceituais e teorias que sugerem a existência de uma reserva única de genes virais no mundo podem prevalecer. Tais teorias sugerem que fagos teriam acesso, em maior ou menor grau, a esse reservatório genético que seria o maior do mundo e muito pouco explorado até o momento. Existem proposições ainda que incluem boa parte dos genes microbianos nesse reservatório, misturados com

genes virais e sendo acessados por intermédio dos vírus (Chibani-Chennoufi, 2004, Weinbauer e Rassoulzadegan, 2004, Breitbart e Rohwer, 2005).

Bacteriófagos também foram implicados recentemente como importantes promotores de evolução microbiana, além de vetores para transmissão de informação genética (Weinbauer e Rassoulzadegan, 2004, Daubin e Ochman, 2004, Comeau e Krisch, 2005). Dois mecanismos foram implicados nestes processos. Observações de que fagos marinhos contêm homólogos de genes que codificam componentes importantes da maquinaria fotossintética de cianobactérias, levaram a sugestões interessantes sobre evolução (Lindell *et al*, 2004, Hambly e Suttle, 2005). Proteínas como D1 e D2, codificadas por genes que podem ser carreados por fagos, são responsáveis pela separação de cargas na fotossíntese II. Contudo, estas proteínas sofrem, impreterivelmente, danos causados por exposição à luz, independente da condição de luminosidade prevalente ou aclimatação. A presença de genes codificadores destas proteínas em fagos garante suprimento de energia às bactérias infectadas, mesmo na ausência da atividade mediada pelas proteínas codificadas por genes pertencentes ao genoma da própria bactéria, beneficiando tanto os vírus como a bactéria hospedeira. Ainda mais interessante, estudos das seqüências desses genes em vírus e bactérias sugerem a transferência horizontal dos mesmos em diferentes momentos (Lindell *et al*, 2004). As variantes de fagos são mais específicas para determinados ambientes do que as variantes bacterianas, possuindo claramente uma história evolutiva distinta, e supostamente as bactérias poderiam se beneficiar dessas variantes virais em determinadas situações (Lindell *et al*, 2004, Hambly e Suttle, 2005). A troca contínua de informações entre fagos e bactérias pode estar promovendo a facilitação de processos metabólicos essenciais aos hospedeiros, através da evolução direta por vírus de genes dos hospedeiros (Lindell *et al*, 2004, Hambly e Suttle, 2005).

Por outro lado, os estudos metagenômicos revelaram uma vasta quantidade de genes específicos de vírus, sem paralelos nos bancos de dados de outros organismos conhecidos (Daubin e Ochman, 2004, Breitbart e Rohwer, 2005). Dados originários de projetos de seqüenciamento genômico indicaram a existência de inúmeros genes ditos “ORFãos”, sem homólogos conhecidos ou função estabelecida para os organismos que os contêm, sendo na maioria das vezes linhagem-específicos e ausentes mesmo em organismos muito relacionados (Brüssow *et al.*, 2004, Daubin e Ochman, 2004, Casjens, 2005). Uma das

proposições recentes integra estas informações, atribuindo aos vírus a origem de diversos genes bacterianos ditos “ORFãos”. Fagos geralmente possuem altas taxas de evolução, recombinação homóloga e trocas genéticas, o que lhes garante todas as características necessárias para a criação e disseminação de genes diversos (Daubin e Ochman, 2004, Comeau e Krisch, 2005). Também é conhecido o fato de que genomas virais inseridos em procariotos podem sofrer um processo relativamente rápido de decaimento, através de inserções ou deleções. Genes que conferem vantagem adaptativa, no entanto, são mantidos por seleção natural e ao longo da evolução podem perder as características que o associariam a um processo de transferência gênica lateral (Brüssow *et al.*, 2004, Daubin e Ochman, 2004, de Almeida *et al.*, 2004, Comeau e Krisch, 2005). Dessa forma, a presença de genes “ORFãos” de procariotos poderia ser explicada através da influência direta de vírus no processo evolutivo. A confirmação dessa teoria irá requerer mais estudos sobre a diversidade viral e ampliação das seqüências genômicas de fagos conhecidas.

Conforme discutido ao longo dessa seção, estudos envolvendo bacteriófagos e seus hospedeiros mudaram diversos paradigmas do conhecimento biológico. Diversas teorias científicas foram propostas baseadas em estudos isolados e observações de diferentes áreas. Estudos mais aprofundados destes vírus permitirão a seleção das teorias que melhor traduzem os eventos ocorridos na natureza.

1.3. Conhecimento atual sobre bacteriófagos

Conforme anteriormente discutido, apenas uma parcela mínima dos fagos existentes no planeta foi estudada a fundo. A partir das cerca de 5300 amostras caracterizadas descritas na literatura formula-se todo o conhecimento atual sobre bacteriófagos (Ackermann, 2003, Gregoracci *et al.*, 2006). Revisaremos agora a extensão desse conhecimento, tendo em vista que é bem possível que diversas generalizações aqui delineadas podem ser errôneas, decorrentes de desvios de amostragem e inferências preliminares.

Estruturalmente, a primeira vista, os bacteriófagos não são muito diversos. Aproximadamente 96% dos fagos isolados atualmente possuem estrutura morfológica similar e, portanto, pertencem a três famílias classificadas em uma mesma ordem (Ackermann, 2003, Gregoracci *et al.*, 2006). A ordem *Caudovirales* congrega vírus icosaédricos, que apresentam DNA fita dupla como material genético e que possuem como

estrutura diferencial a cauda, uma estrutura única na natureza responsável pelo reconhecimento dos hospedeiros e injeção do material genético (Ackermann, 2003, Casjens, 2005, Gregoracci *et al.*, 2006). As três famílias diferem em relação à morfologia da cauda, sendo as variantes uma cauda longa e não-contrátil (*Siphoviridae*), uma cauda contrátil (*Myoviridae*) e uma cauda bem curta (*Podoviridae*) (Ackermann, 2003, Chibani-Chennoufi, 2004, Suttle, 2005, Gregoracci *et al.*, 2006). Apesar dessa morfologia aparentemente limitada, a análise das seqüências que codificam as proteínas do capsídeo revela uma considerável diversidade. Mesmo em fagos com morfologias e ciclos biológicos muito próximos há uma considerável variação de seqüência genética (Casjens, 2005). Também existem relatos na literatura de certos bacteriófagos contendo domínios estruturais em seus capsídeos que não influem em seu ciclo biológico. Esses domínios estão presentes e supostamente foram selecionados por sua interação com o ambiente ocupado pelo fago e seu hospedeiro. No exemplo relatado, um fago T4 possui um domínio denominado Hoc (“proteína externa do capsídeo altamente imunogênica”) que possivelmente é capaz de interagir com células eucarióticas, na presença das quais seu hospedeiro pode habitar (Dabrowska *et al.*, 2005a,b).

Os outros 4% dos fagos isolados revelam uma diversidade morfológica maior, apresentando vírus cúbicos, filamentosos e pleomórficos. Estes fagos são classificados em 10 famílias distintas, que diferem nas suas propriedades mais básicas, e provavelmente constituem grupos ou linhagens filogenéticas independentes (Ackermann, 2003, Gregoracci *et al.*, 2006). Várias destas famílias possuem poucos membros, sendo que estes em alguns casos infectam hospedeiros incomuns, como micoplasmas e arqueobactérias (Ackermann, 2003).

Existem evidências estruturais indicando a existência de linhagens ancestrais comuns entre vírus cujos hospedeiros pertencem a domínios distintos. Similaridade morfológica observada entre as proteínas que empacotam DNA de fagos caudados e herpesvírus, semelhanças entre arranjos do capsídeo de adenovírus e fagos PRD1, e similaridades replicativas e estruturais entre vírus que infectam fungos (*Totiviridae*), eucariotos superiores (*Reoviridae*) e bactérias (*Cystoviridae*) podem ser encontradas na literatura (Bamford, 2003, Benson *et al.*, 2004). As evidências nas quais estas proposições

se baseiam, no entanto, são bastante limitadas e uma maior amostragem seria necessária para consolidá-las.

Em termos de material genético, bacteriófagos apresentam uma variação maior. Fagos podem possuir genomas constituídos de RNA ou DNA, fita simples ou dupla, linear ou circular e segmentado ou único, sendo que nem todas as combinações possíveis estão presentes (Fuhrman, 1999, Ackermann, 2003, Casjens, 2005, Skurnik e Strauch, 2005, Gregoracci *et al.*, 2006). O arranjo genômico geralmente obedece a módulos funcionais, agrupamentos de genes responsáveis por tarefas específicas como empacotamento, formação da cauda e lise (Canchaya *et al.*, 2003, Pedulla *et al.*, 2003, Brüssow *et al.*, 2004, Weinbauer e Rassoulzadegan, 2004, Breitbart e Rohwer, 2005, Casjens, 2005, Gregoracci *et al.*, 2006). Esse arranjo modular permite recombinações em episódios de superinfecção e mesmo recombinação com fagos inseridos nos genomas dos hospedeiros durante uma infecção simples. A esse arranjo em módulos também é atribuída a não existência de um gene universal em bacteriófagos, visto a propensão à recombinação atrelada a essa arquitetura. Os estudos de seqüenciamento revelam também a existência de genes acessórios em genomas de fagos, sem relação nenhuma com o ciclo biológico dos vírus. Chamados de *morons* (significando “mais DNA”) estes genes provavelmente são originados por recombinação ilegítima com o genoma hospedeiro e, se representarem vantagem adaptativa para outro hospedeiro, serão selecionados para permanência na população viral (Brüssow *et al.*, 2004, Lindell *et al.*, 2004, Breitbart e Rohwer, 2005, Gregoracci *et al.*, 2006). Diversos fatores de patogenicidade podem ser encontrados nessa categoria e estudos com micobacteriófagos revelaram uma diversidade enorme de genes, incluindo genes humanos, que provavelmente ainda não haviam sofrido seleção natural (Pedulla *et al.*, 2003).

A respeito de ciclos biológicos de fagos uma figura complexa também emerge. Os fagos possuem ciclos com pontos comuns com os demais vírus, mas com algumas particularidades próprias. O passo de adsorção é inicial a toda infecção viral (Weinbauer, 2004, Comeau e Krisch, 2005, Skurnik e Strauch, 2005, Gregoracci *et al.*, 2006). Bacteriófagos geralmente adsorvem em dois passos distintos, o primeiro reversível e o segundo irreversível e dependente de temperatura (Lindberg, 1973, Weinbauer, 2004, Comeau e Krisch, 2005, Gregoracci *et al.*, 2006). A atração eletrostática influi bastante na

primeira etapa, enquanto na segunda as ligações se tornam mais estáveis e enzimas hidrolíticas atuam para facilitar a passagem de material genético através da parede bacteriana (Lindberg, 1973, Weinbauer, 2004, Gregoracci *et al.*, 2006). Praticamente todas as estruturas bacterianas expostas na parede podem ser utilizadas por bacteriófagos como receptor, tanto em bactérias Gram-positivas como Gram-negativas, bem como estruturas acessórias em alguns casos (pili, flagelo e cápsula) (Lindberg, 1973, Skurnik e Strauch, 2005, Gregoracci *et al.*, 2006). Recentemente, foi reconhecido, em fagos que infectam o gênero *Bordetella*, um novo mecanismo promotor de variabilidade no reconhecimento de receptores. Estes fagos produzem um RNA mensageiro que é reversamente transcrito e recombinado com o gene responsável pelo anti-receptor viral. Dessa forma, dada a propensão a erros da enzima transcriptase reversa, são geradas inúmeras variantes do anti-receptor, possibilitando a exploração de uma superfície bacteriana em constante mudança, em um mecanismo comparado por alguns autores à geração de variação das imunoglobulinas humanas (Liu *et al.*, 2002, Chibani-Chennoufi, 2004).

A etapa seguinte do ciclo biológico envolve o desnudamento viral. Conforme mencionado anteriormente, a maioria dos fagos permeabiliza a parede bacteriana, através da utilização de enzimas, para facilitar a passagem do material genético. Poucos são os casos onde há entrada do capsídeo viral dentro da célula hospedeira, pois a maioria dos capsídeos de fagos permanece aderida a parede exterior da célula, enquanto o material genético é injetado (Weinbauer, 2004, Skurnik e Strauch, 2005, Gregoracci *et al.*, 2006). Existe considerável variação nos ciclos a partir deste ponto, e algumas incertezas decorrentes de complicações experimentais.

Existem fagos que infectam cronicamente as bactérias, estabelecendo uma relação de verdadeiro parasitismo (Weinbauer e Rassoulzadegan, 2004). Estes fagos geralmente não recombina seus genomas com o de seus hospedeiros e permanecem produzindo baixas quantidades de vírus continuamente, que emergem por brotamento (Fuhrman, 1999, Weinbauer, 2004, Gregoracci *et al.*, 2006).

Outros fagos, denominados virulentos, produzem altas quantidades de partículas virais, redirecionando todas ou quase todas as vias metabólicas do hospedeiro para sua replicação. Nesse ciclo, denominado lítico, segue-se o acúmulo de partículas virais no citoplasma bacteriano com conseqüente liberação após um rompimento da membrana. Esse

rompimento é facilitado também pelo acúmulo de enzimas, que enfraquecem a parede e a membrana, além da quantidade de partículas no interior da bactéria que fornece a pressão necessária (Fuhrman, 1999, Weinbauer, 2004, Skurnik e Strauch, 2005, Gregoracci *et al.*, 2006). Fagos líticos geralmente obedecem a equilíbrios de predador-presa com seus hospedeiros e essa dinâmica populacional distinta lhes confere o papel predatório discutido anteriormente em cadeias alimentares microbianas (Fuhrman, 1999, Weinbauer, 2004, Weinbauer e Rassoulzadegan, 2004). O ciclo lítico também está relacionado com o processo de transdução generalizada. Neste processo, no momento do empacotamento do material genético nas partículas virais, ocorre a inclusão de porções de material genético do hospedeiro em capsídeos de fagos. Essa informação genética pode ser transferida para outra célula, caso esse capsídeo encontre e injete seu conteúdo em outro hospedeiro (Canchaya *et al.*, 2003, Weinbauer, 2004, Gregoracci *et al.*, 2006).

Existem também fagos chamados lisogênicos, que integram seu material genético ao genoma procarioto após a infecção, como discutido anteriormente. Neste estado, há produção de proteínas responsáveis pelo silenciamento da expressão da maior parte dos genes virais bem como pela sua própria automanutenção (Fuhrman, 1999, de Almeida *et al.*, 2004, Weinbauer, 2004, Skurnik e Strauch, 2005). Estas proteínas conferem ao hospedeiro procarioto imunidade a bacteriófagos cujos módulos de lisogenia sejam relacionados. Denomina-se profago o estado de um bacteriófago inserido no genoma hospedeiro. Este estado não é permanente, contudo. Agentes agressores de DNA, como luz ultravioleta e agentes químicos, podem desencadear alterações fisiológicas que culminam com a indução do profago, que passa para um ciclo lítico, produz progênie e lisa o hospedeiro (Fuhrman, 1999, Chibani-Chennoufi, 2004, Weinbauer, 2004, Skurnik e Strauch, 2005, Gregoracci *et al.*, 2006). Em outros casos, o DNA exógeno pode ser danificado através da inserções de elementos móveis e pela ocorrência de deleções. Em longo prazo, acredita-se que apenas genes que possuam, ou sejam cooptados para funções benéficas para os hospedeiros sejam mantidos enquanto os demais sejam eliminados por deleção e/ou recombinação (Brüssow *et al.*, 2004, de Almeida *et al.*, 2004, Weinbauer e Rassoulzadegan, 2004, Breitbart e Rohwer, 2005, Comeau e Krisch, 2005). O ciclo lisogênico também está associado ao processo de transdução especializada. Durante a indução é possível que partes próximas do genoma bacteriano sejam excisadas junto com o

genoma viral. Esses genes podem originar os *morons*, discutidos anteriormente, e podem ser incorporados ao genoma hospedeiro durante uma próxima inserção. Quando esta inserção modifica propriedades do procarioto infectado designa-se o processo como conversão lisogênica (Canchaya *et al.*, 2003, Chibani-Chennoufi, 2004, Weinbauer, 2004, Weinbauer e Rassoulzadegan, 2004, Gregoracci *et al.*, 2006).

Por fim, existe um ciclo controverso conhecido por pseudolisogênico (Fuhrman, 1999, Weinbauer, 2004, Gregoracci *et al.*, 2006). Apesar de ser pouco conhecido, acredita-se que seja o mais difundido na natureza. Neste ciclo não há inserção do material genético viral no genoma do hospedeiro, como no ciclo lisogênico, e não há lise da maior parte da população infectada, como ocorre no ciclo lítico. Uma parte da população infectada, no entanto, sofre lise liberando novas partículas virais. Diversas explicações vigoram para a existência destes estado, como incapacidade de infecção por destruição enzimática, ou por falta de receptores, ou imunidade promovida por fago lisogênico que muta frequentemente para ciclo lítico. A incerteza envolvendo o processo permite sugerir que este estado representa diversos ciclos biológicos não reconhecidos (Fuhrman, 1999, Weinbauer, 2004, Gregoracci *et al.*, 2006).

Após a liberação ou extrusão da partícula viral o ciclo se fecha com o estágio de transmissão, onde a partícula infecciosa busca outra célula permissível e reinicia o processo de infecção. Estima-se que esta etapa seja a que demanda mais tempo no ambiente e também seja a mais propensa a não se concluir (Fuhrman, 1999, Weinbauer, 2004). No entanto, apenas uma pequena parcela de vírus precisa atingir seu objetivo para que a população viral seja mantida (Weinbauer, 2004, Gregoracci *et al.*, 2006).

Em suma, unificando informações de morfologia, ciclo biológico, genética e acrescentando a especificidade de hospedeiros obtém-se considerável diversidade, mesmo partindo de uma amostragem ainda incerta quanto a sua significância. A ampliação desta amostragem se mostrará essencial para sedimentar tais conhecimentos ou promover as mudanças necessárias.

1.4. Bacteriófagos como agentes terapêuticos

Logo após sua descoberta, na segunda década do século passado, mesmo sem ter sua natureza plenamente esclarecida, os bacteriófagos foram empregados em benefício do homem (Merril *et al.*, 1996, Summers, 2001, Ackermann, 2003, Chibani-Chennoufi, 2004,

Gregoracci *et al.*, 2006). Em uma época onde as bases da imunologia e da virologia ainda estavam indefinidas, os fagos encontraram aplicação direta na contenção de bactérias patogênicas em infecções humanas (Merril *et al.*, 1996, Levin e Bull, 2004, Schoolnik, 2004, Gregoracci *et al.*, 2006).

Um dos "co-descobridores" dos fagos, Félix D'Herelle, possuía considerável experiência em métodos de controle biológico, tendo utilizado bactérias entomopatogênicas para contenção de pragas de gafanhoto na América Central e do Sul e norte da África (Sulakvelidze *et al.*, 2001, Summers, 2001, Chibani-Chennoufi, 2004). Logo após a observação de lise em culturas bacterianas, D'Herelle reconheceu a natureza viral deste fenômeno e cunhou o termo bacteriófago (do latim "comedor de bactérias") (Ackermann, 2003). Seguindo a linha do Instituto Pasteur, do qual fazia parte, logo propôs a utilização prática desses agentes, delineando inclusive uma teoria sobre "agentes exógenos de cura", na qual os fagos seriam a explicação para a resolução de infecções bacterianas em organismos superiores (Summers, 2001, Gorski e Weber-Dabrowska, 2005, Gregoracci *et al.*, 2006). As experimentações e aplicações logo se expandiram englobando infecções veterinárias (tifose aviária, septicemia hemorrágica bovina, etc.) e infecções humanas (peste bubônica, cólera, infecções de pele, entre outras) (Sulakvelidze *et al.*, 2001). Contudo, falhas decorrentes da falta de entendimento sobre os vírus determinaram resultados variáveis nos tratamentos (Merril *et al.*, 1996, Biswas *et al.*, 2001, Summers, 2001, Gregoracci *et al.*, 2006). A emergência dos antibióticos na década de 40, com sua fácil produção e estabilidade, ocasionou o esquecimento da utilização terapêutica de fagos no Ocidente (Merril *et al.*, 1996, Sulakvelidze *et al.*, 2001, Summers, 2001, Goodridge, 2004, Gregoracci *et al.*, 2006).

Este período coincidiu com o surgimento da Guerra Fria dificultando a expansão da indústria de antibióticos no lado soviético. Neste caso, as dificuldades com a obtenção de fármacos antibacterianos culminaram alternativamente na pesquisa envolvendo bacteriófagos. Inúmeros estudos foram realizados durante este tempo, mas as publicações em línguas não-inglesas não foram reconhecidas. Ainda assim, o leste europeu alberga dois grandes centros de pesquisa envolvendo terapia com bacteriófagos, e seus resultados servem de base para estudos modernos (Sulakvelidze *et al.*, 2001, Summers, 2001, Gorski e Weber-Dabrowska, 2005).

No Ocidente, o uso disseminado de antibióticos promoveu a contenção de diversos agentes bacterianos e suscitou esperanças de que infecções bacterianas não representariam problemas de saúde em questão de tempo. Os microorganismos, no entanto, provaram-se mais versáteis do que se supunha e, através de mutações e transferência gênica horizontal, desenvolveram diversos mecanismos de resistência a drogas (Garrett, 1995, Levin *et al.*, 1999, Sulakvelidze *et al.*, 2001). Atualmente já foram reconhecidas linhagens de bactérias resistentes a todos os antibióticos em uso comercial e patógenos multi-resistentes tornam-se cada vez mais comuns (Garrett, 1995). Dado tempo suficiente é possível que para o tratamento de algumas infecções bacterianas retornemos à era pré-antibiótica, onde tais infecções eram de difícil tratamento e os pacientes evoluíam geralmente para o óbito. Desta forma, há uma necessidade urgente de desenvolvimento de práticas terapêuticas alternativas e os fagos ressurgem como uma alternativa interessante (Merril *et al.*, 1996, Sulakvelidze *et al.*, 2001, Biswas *et al.*, 2002, Skurnik e Strauch, 2005, Gregoracci *et al.*, 2006).

A terapia envolvendo bacteriófagos possui diversas características que diferem marcadamente da antibioticoterapia. No entanto, boas idéias e experimentos elaborados vêm derrubando por terra todas as críticas a essa prática (Skurnik e Strauch, 2005, Gregoracci *et al.*, 2006).

O tamanho e a complexidade de partículas virais, em comparação com antibióticos, gerou dúvidas quanto à capacidade de distribuição de fagos no organismo (Projan, 2004). Revisões recentes sobre o assunto refutaram completamente estes argumentos (Schoolnik *et al.*, 2004, Dabrowska *et al.*, 2005b, Gorski e Weber-Dabrowska, 2005, Gregoracci *et al.*, 2006). Dados experimentais demonstram a impressionante capacidade de penetração de bacteriófagos em vertebrados, ultrapassando inclusive, em casos específicos, a barreira hemato-encefálica (Dabrowska *et al.*, 2005b). Nesses casos, os bacteriófagos fornecem uma ferramenta inovadora para o tratamento de viciados em cocaína. A utilização de fagos recombinantes que expressam proteínas ligantes de cocaína permite que essas proteínas atinjam o sistema nervoso central do paciente e removam a droga de seu local de ação. É interessante destacar que as proteínas ligantes de cocaína não são eficientes na passagem da barreira hemato-encefálica em sua forma nativa, mas atravessam essa barreira facilmente quando complexadas nos capsídeos de certos bacteriófagos (Carrera *et al.*, 2004). Teoricamente, quaisquer locais de infecções seriam atingidos, com manutenção do

potencial lítico nestes sítios. A capacidade de multiplicação ampliaria a eficiência terapêutica nos sítios específicos de colonização bacteriana, elevando o título viral nos locais mais necessários. Após a eliminação dos hospedeiros os fagos aparentemente são eliminados rapidamente do organismo. Considerando a ubiquidade e capacidade de penetração destes vírus, há sugestões da influência de bacteriófagos endógenos na contenção de bactérias no organismo, contribuindo para a regulação do ecossistema microbiano em nossos corpos (Gorski e Weber-Dabrowska, 2005). Determinadas teorias propõem que a terapia envolvendo fagos seja natural, ocorrendo o tempo todo em organismos superiores, enquanto outras sugerem a contribuição de fagos ao sistema imune na imunovigilância contra bactérias, vírus de eucariotos e câncer (Gorski e Weber-Dabrowska, 2005). Ainda assim, apesar dessa provável interação contínua, não há relatos de infecção ou danos causados diretamente por bacteriófagos a células eucarióticas, (Gorski e Weber-Dabrowska, 2005, Gregoracci *et al.*, 2006).

A interação de fagos com o sistema imune representa outro ponto de discussão e estudo (Projan, 2004, Dabrowska *et al.*, 2005, Gorski e Weber-Dabrowska, 2005, Gregoracci *et al.*, 2006). A resposta imune contra fagos é parte da resposta natural gerada contra infecções bacterianas. Embora exista a possibilidade de neutralização de fagos por anticorpos, estudos demonstram que a imunogenicidade de fagos geralmente é baixa e a terapia comumente está finalizada antes da consolidação de uma resposta imune específica (Weber-Dabrowska *et al.*, 2003, Dabrowska *et al.*, 2005b, Gorski e Weber-Dabrowska, 2005). Relatos da literatura indicam também uma regulação positiva da imunidade deprimida em alguns casos (Weber-Dabrowska *et al.*, 2003, Gorski e Weber-Dabrowska, 2005). Há ainda a possibilidade de seleção de variantes de fagos, com características morfológicas e imunogênicas distintas (Merril *et al.*, 1996). Tal metodologia foi empregada para obtenção de variantes de fagos que permanecem mais tempo em circulação, através de alterações que permitem maior evasão contra o sistema mononuclear fagocitário, principal responsável pela eliminação de fagos do organismo. A passagem serial em camundongos, intermediada pela amplificação de vírus circulantes, permitiu a obtenção de fagos com meia-vida biológica mais elevada e conseqüentemente com maior potencial terapêutico (Merril *et al.*, 1996, Biswas *et al.*, 2002).

A evolução de resistência bacteriana a fagos é outro ponto alvo de críticas (Projan, 2004, Schoolnik *et al.*, 2004, Gregoracci *et al.*, 2006). O clássico experimento de flutuação de Luria-Delbruck demonstrou que mutações resultando em resistência surgem com frequência de cerca de 10^{-6} . São conhecidos inclusive diversos mecanismos de defesa anti-fagos, incluindo inibição da adsorção, inibição da injeção do material genético, sistemas de restrição-modificação de DNA e infecções abortivas (Weinbauer, 2004, Comeau e Krisch, 2005). É necessário destacar, contudo, que tais experimentos representam ambientes controlados em laboratório e não refletem a complexidade do ambiente *in vivo* (Skurnik e Strauch, 2005). Diversos experimentos em animais corroboram esta diferença e modelos matemáticos apontam que a evolução de resistência não interfere com a terapia conquanto os títulos bacterianos sejam reduzidos a um nível controlável pelo sistema imune (Levin and Bull, 2004, Skurnik e Strauch, 2005). Ainda é importante ressaltar que os fagos também são capazes de evoluir, contornando os mecanismos de defesa bacterianos, embora a extensão dessa co-evolução ainda não esteja completamente esclarecida (Levin e Bull, 2004, Weinbauer, 2004, Comeau e Krisch, 2005, Gorski e Weber-Dabrowska, 2005).

Uma abordagem interessante a respeito de resistência, fruto de estudos aprofundados da interação parasita-hospedeiro, envolve a utilização de bacteriófagos cujo receptor constitui um importante determinante de virulência da bactéria. A evolução de resistência ao fago, nesse caso específico, envolveria a oclusão do receptor e conseqüentemente diminuiria drasticamente a virulência do patógeno (Skurnik e Strauch, 2005). Por outro lado, a manutenção do fator de virulência acarretaria a sensibilidade bacteriana ao fago lítico, de modo que a terapia seria bem sucedida neste caso. Esta situação foi exemplificada no caso de um fago lítico que reconhecia o antígeno K1 de *E. coli*, como molécula receptora. Este fago foi utilizado com sucesso na terapia de *E. coli* em um modelo bovino de infecção (Smith e Huggins, 1982). Provavelmente, estudos detalhados sobre interação de outros patógenos com seus respectivos fagos permitirão a elaboração de estratégias similares para contenção de outros agentes.

Diversas outras críticas foram igualmente refutadas experimentalmente, e é clara a necessidade de mais estudos para a determinação da viabilidade desta prática (Skurnik e Strauch, 2005, Gregoracci *et al.*, 2006). Os estudos mais avançados neste tópico, envolvendo o fago ENB6 e *Enterococcus faecalis* resistentes a vancomicina, estão em

testes de fase II nos Estados Unidos (Bradbury, 2004). No geral, os resultados obtidos encorajam estudos nesse campo, e a incapacidade da indústria farmacêutica em acompanhar a evolução de bactérias resistentes determina a aplicação de terapias alternativas e/ou complementares, como a terapia com bacteriófagos (Skurnik e Strauch, 2005, Gregoracci *et al.*, 2006).

Em suma, os bacteriófagos são as entidades biológicas mais abundantes da natureza. Existe um verdadeiro abismo entre o conhecimento experimental a respeito destes vírus e as inferências teóricas baseadas em amostragens específicas. Ainda assim, são considerados importantes participantes em diversos temas, como ciclagem de nutrientes e transferência gênica horizontal. Sua diversidade global, contudo, permanece alvo de controvérsias, embora seja consenso a existência de uma alta diversidade local. Os fagos também são considerados possíveis agentes terapêuticos alternativos e/ou complementares a terapias convencionais. Dado o aumento crescente de bactérias resistentes e multirresistentes, tais alternativas estão sendo cada vez mais exploradas recentemente.

2. OBJETIVOS

- Verificação da potencialidade do isolamento, a partir de esgoto, de bacteriófagos líticos para bactérias Gram positivas e Gram negativas;
- Isolamento e caracterização de bacteriófagos líticos específicos contra patógenos humanos; estabelecimento de um banco de bacteriófagos local;
- Seleção de bacteriófagos com maior potencial bacteriolítico para potencial aplicação em terapia e controle biológico bacteriano;
- Testes *in vitro* da atividade biológica de fagos candidatos a agentes terapêuticos;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens bacterianas

As amostras bacterianas utilizadas na verificação do potencial lítico de isolados de bacteriófagos foram linhagens pertencentes à coleção de nosso laboratório e classificadas como *Acinetobacter baumannii*, *Chromobacterium violaceum*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* (Enterohemorrágica e Enteropatogênica), *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* Typhi, *Salmonella enterica* Typhimurium, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella boydii*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Yersinia enterocolitica*. Devido à histórica classificação de *Shigella* spp em quatro espécies, esta nomenclatura foi utilizada no texto, embora seja importante salientar que estudos moleculares re-classificaram este “gênero” e as quatro “espécies” *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. sonnei* e *S. boydii* como sorotipos de *E. coli* (Lan e Reeves, 2002).

A linhagem testada de *C. violaceum* foi parte das amostras providas do projeto de sequenciamento do Consórcio Projeto Genoma Nacional Brasileiro, cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho da Universidade Federal do Amazonas. Estas amostras foram provenientes do rio Negro na Amazônia. As linhagens de *E. coli*, *S. enterica* e *Shigella* sp. foram provenientes de isolados clínicos e objeto de estudo de outros projetos de nosso laboratório. Essas linhagens assim como as amostras de *A. baumannii*, *E. cloacae*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa* foram isolados clínicos obtidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. Roberto Martinez. A linhagem de *Y. enterocolitica*, também alvo de estudo de outro projeto de nosso laboratório, foi cedida gentilmente pela Profa. Dra. Deise Pasetto Falcão, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP. As amostras de *S. aureus* e *S. pyogenes* foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Cláudia Maria Leite Maffei, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

3.2. Cultivo bacteriano

Os meios de cultura de rotina foram os meios líquidos LB (Meio Luria-Bertani) e BHI (Infusão Cérebro-Coração) e os seus respectivos meios sólidos, cuja preparação

incluiu a adição de ágar a 1,5% (Sambrook e Russell, 2001). Os cultivos foram realizados a temperatura de 37°C, com ou sem agitação.

As bactérias *Y. enterocolitica* e *C. violaceum* exigiram alguns cuidados especiais. Os cultivos da primeira foram realizados entre 25-28°C, com ou sem agitação, e os da segunda envolveram incubações na temperatura de 30-32°C, com ou sem agitação.

3.3. Isolamento de bacteriófagos de amostras líquidas

As amostras de fagos foram isoladas a partir de água de esgoto coletada junto ao Departamento de Água e Esgoto de Ribeirão Preto (DAERP). Foram adicionados 58g de NaCl para cada litro de esgoto, seguido por centrifugação a 12.000g por 15 minutos (min). O sobrenadante foi decantado em recipiente separado e misturado com polietilenoglicol (PEG, peso molecular 8.000), sendo a concentração final de PEG igual a 10% (m/v). Este sobrenadante contendo PEG foi decantado durante a noite a 4°C. Em seguida, foi centrifugado a 11.000g por 20min. O precipitado resultante foi ressuspense em 8-10ml de tampão de diluição de fago (SM; descrito em Sambrook e Russell, 2001) e extraído uma vez, com igual volume de clorofórmio. O clorofórmio e os restos celulares bacterianos foram removidos por decantação a 4°C e centrifugação (4000g, 10min, 4°C). O concentrado de vírus resultante foi mantido a 4°C, por até 12 meses, com recuperação bem sucedida de fagos neste período. Este concentrado serviu como fonte de bacteriófagos para o plaqueamento (descrito em seguida no item 3.4), independentemente para cada linhagem bacteriana testada.

3.4. Plaqueamento de bacteriófagos

Duas variantes do protocolo de plaqueamento descritas na literatura (Sambrook e Russell, 2001) foram empregadas em nossos estudos.

A primeira variante, utilizada preferencialmente durante o isolamento inicial (item 3.3) e titulações exatas (item 3.6), envolveu incubação prévia de fagos com as bactérias. Uma alíquota de 300µl do concentrado de vírus foi misturada com 200µl de uma cultura bacteriana recente, em fase exponencial de crescimento. A suspensão resultante foi incubada por 5-30min a 37°C e recebeu, em seguida, 3ml de meio apropriado semi-sólido

(0,6-0,8% ágar) fundido a 50°C. Após agitação manual, a mistura resultante foi despejada em placa de cultura contendo o meio apropriado. Seguiu-se a solidificação do meio semi-sólido, à temperatura ambiente, e as placas foram incubadas durante a noite em estufa, sob temperatura adequada. No dia seguinte, a presença de placas de lise foi observada para cada amostra. Após esta preparação, placas de lise individuais foram colhidas com palitos autoclavados para servir como fonte para propagação de fagos em cultura líquida (descrito em 3.5). A repetição deste protocolo, ao menos três vezes para cada isolado, garantiu o isolamento de um único fago, por amostra bacteriana, para análises posteriores.

A segunda variante foi empregada principalmente para titulações aproximadas (item 3.6) e testes de especificidade (item 3.7). Uma alíquota de 500µl de cultura bacteriana recente, em fase exponencial de crescimento, foi misturada com 3ml de meio semi-sólido apropriado, fundido a 50°C. Após agitação manual, a mistura foi despejada em placas de cultura contendo o meio apropriado. As placas foram mantidas à temperatura ambiente, para solidificação do meio semi-sólido, e receberam alíquotas de 5-50µl de suspensão de bacteriófagos, cuidadosamente pipetadas sobre a superfície do meio. As placas foram em seguida incubadas novamente à temperatura ambiente até secagem das gotas. Foram então incubadas durante a noite em estufa, sob temperatura adequada. A observação de lise nos pontos que receberam as gotas foi realizada no dia seguinte.

3.5. Propagação de bacteriófagos

As amostras bacterianas apropriadas foram pré-cultivadas, sob temperatura ótima (conforme descrito no item 3.2), durante a noite, em meio adequado. No dia seguinte, 0,5ml de cada cultura foi inoculada em 5ml do meio apropriado para cada bactéria. Esta nova cultura foi cultivada, sob temperatura adequada, com aeração completa, até a fase exponencial de crescimento (determinada empiricamente através da mensuração de densidade ótica da cultura a 600nm). Cada cultura recebeu fagos isolados independentemente (amostras líquidas ou placas de lise individuais) bem como mais 4-5ml de meio de cultura esterilizado. Seguiu-se nova incubação com aeração completa, sob temperatura adequada, por 12-16 horas. Algumas gotas de clorofórmio foram adicionadas e, após homogeneização, as culturas foram incubadas novamente, sob as condições citadas acima, por mais 15min. Adicionou-se NaCl para a concentração final de 1M com o objetivo

de dissociar os fagos dos restos celulares, seguida de repouso, a 4°C por 1 hora, para separação da fase aquosa e do clorofórmio. As culturas foram então centrifugadas para sedimentação de restos celulares (5000g, 20min, 4°C) e o sobrenadante foi cuidadosamente recolhido e transferido para tubos limpos sendo armazenado a 4°C. As amostras foram geralmente tituladas em seguida para avaliação do sucesso da técnica e viabilidade dos fagos.

3.6. Titulação de bacteriófagos

Uma placa contendo a bactéria hospedeira foi preparada conforme a segunda variante descrita no protocolo de plaqueamento (item 3.4). Após solidificação do meio semi-sólido as placas receberam cuidadosamente gotas de 5-10µl de diluições apropriadas, da amostra de fago a ser titulada, em tampão SM. Ponteiras limpas foram empregadas em cada etapa da diluição e cada aplicação das gotas, a fim de evitar contaminações. As faixas de diluição empregadas foram determinadas empiricamente. As placas foram incubadas em estufa, após secagem das gotas, sob temperatura apropriada durante a noite. Observou-se a formação de placas de lise no dia seguinte, nos pontos que receberam as gotas. Este protocolo forneceu a titulação aproximada das amostras.

A titulação exata, quando necessária, foi obtida através da primeira variante de plaqueamento (descrita em 3.4) e dos resultados da titulação aproximada descrita acima. A amostra de fagos foi diluída até o título aproximado determinado empiricamente e incubada brevemente com a bactéria em fase exponencial de crescimento (cerca de 5min). Foi então misturada com meio semi-sólido fundido a 50°C e despejada em placa, com meio de cultura apropriado. Após solidificação do meio semi-sólido, a placa foi incubada em estufa, sob temperatura adequada. No dia seguinte, o número de placas de lise foi contado e o título de bacteriófagos, expresso em unidades formadoras de placas (PFUs), foi determinado de acordo com a fórmula abaixo:

$$\frac{\text{Número de placas de lise}}{\text{Volume da diluição (}\mu\text{l)} \times \text{Fator de diluição}} \times \frac{1000 \mu\text{l}}{\text{ml}} = \text{PFU/ml}$$

3.7. Avaliação da especificidade de hospedeiros

Os fagos isolados foram avaliados quanto a sua especificidade de hospedeiros. Uma amostra bacteriana diferente do hospedeiro de isolamento foi plaqueada, conforme a segunda variante do protocolo de plaqueamento (item 3.4). Após solidificação do meio semi-sólido, alíquotas de 5-10µl das amostras em teste foram cuidadosamente pipetadas sob a superfície do ágar. Após secagem das gotas, à temperatura ambiente, as placas foram incubadas, sob temperatura adequada, em estufa durante a noite. A observação de diferentes graus de lise bacteriana nos pontos de aplicação das amostras foi avaliada no dia seguinte.

Foram empregadas nesta etapa do estudo todas as bactérias Gram-negativas utilizadas no estudo, conforme descrito na Tabela I (em Resultados e Discussão).

3.8. Purificação preliminar de bacteriófagos

Foi observada a necessidade de uma etapa de purificação dos bacteriófagos previamente à análise morfológica, para eliminar restos bacterianos presentes em grande quantidade nos lisados. Para tal fim, foram comparadas as técnicas de ultracentrifugação zonal em gradiente de sacarose (12,5-52,5%) e ultracentrifugação em colchão (“cushion”) de sacarose (20-30%). Ambas as técnicas baseiam-se em protocolos modificados descritos em Bachrach e Friedmann (1971) e Minamishima *et al.* (1968).

3.9. Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Transmissão

Uma alíquota de 5-10µl da de cada bacteriófago, após purificação em sacarose (item 3.8), foi aplicada sobre uma tela de microscopia eletrônica de 200-300 mesh, de níquel ou cobre, previamente revestida com carbono. A amostra foi seca, após 5min de incubação à temperatura ambiente, utilizando papel de filtro umedecido. Cada tela foi então flutuada separadamente sobre uma gota de um dos contrastantes testados, por 5min. Foram avaliados o ácido fosfotungstênico (PTA - pH 7,2) e o acetato de uranila 2% (UA - pH 4,5). O excesso de contrastante foi também seco utilizando papel de filtro umedecido, e procedeu-se uma incubação mínima de 40min à temperatura ambiente antes da deposição

da tela na caixa de armazenamento. As telas foram posteriormente submetidas à visualização por microscopia eletrônica de transmissão, no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia, UNICAMP.

3.10. Determinação do Ácido Nucléico Viral

As amostras de fagos foram analisadas a respeito do seu material genético. A análise morfológica prévia sugeriu a presença de DNA fita-dupla nos capsídeos virais. O fago P22 de *S. enterica* Typhimurium foi usado como referência nestes experimentos.

3.10.1. Extração rápida de DNA. A extração de DNA envolveu tratamento prévio das suspensões de bacteriófagos com DNase por 30min a 1 hora, a 37°C, para remoção de DNAs bacterianos. Seguiu-se a adição de SDS-EDTA (2,5x) seguida de incubação por 5min a 37°C. Este procedimento objetivou romper o capsídeo dos vírus e inativar DNases (Sambrook e Russell, 2001). O tampão também continha os corantes azul de bromofenol e xileno-cianol e, portanto, permitiu a visualização da frente de migração na eletroforese em gel de agarose.

3.10.2 Eletroforese. Os ácidos nucléicos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose de acordo com metodologia descrita em Sambrook e Russell (2001).

3.10.3 Extração de DNA com fenol. A extração rápida descrita acima (item 3.10.1) permite a visualização dos ácidos nucléicos, mas impede a análise posterior envolvendo digestão enzimática. A extração utilizando fenol, descrita também em Sambrook e Russell (2001), permite tal análise e foi empregada neste passo. Este protocolo envolveu tratamento com proteinase K e SDS, seguido de incubação a 56°C por 1 hora. Após resfriamento a temperatura ambiente, a amostra foi tratada em três etapas, com fenol-clorofórmio (duas vezes) e clorofórmio, respectivamente. Após estas etapas, o DNA viral foi precipitado com etanol e ressuspendido em água milli-Q autoclavada.

3.10.4 Digestões enzimáticas. A confirmação do isolamento de DNA fita dupla foi realizada através de digestão enzimática utilizando DNase e nuclease S1, seguindo os protocolos sugeridos pelos fabricantes destas enzimas. A visualização dos produtos das digestões foi realizada também por eletroforese em gel de agarose, conforme descrito anteriormente (item 3.10.2).

3.11. Atividade biológica *in vitro* do fago Shfl1.

As análises prévias do bacteriófago Shfl1 isolado contra *S. flexneri* encorajaram estudos posteriores sobre sua atividade biológica e sua utilização para fins terapêuticos ou de controle ambiental deste patógeno. Assim, optamos por dois ensaios *in vitro* como etapa inicial para avaliação da atividade bactericida deste vírus.

3.11.1. Ensaio da atividade bactericida em cultura de células HeLa. Culturas de células HeLa foram cultivadas até a confluência da monocamada, em placas de 6 poços, através da adição de 2 ml de uma suspensão de 4×10^5 células/ml, ressuspensas em meio mínimo essencial (MEM), com 10% de soro bovino fetal (FBS), sem adição de antibióticos. Foram então infectadas com cerca de 10^8 CFU de *S. flexneri* 17 (hospedeiro de isolamento de Shfl1), ressuspensa em MEM, de acordo com a metodologia descrita por Ménard e Samsonetti (1994). As placas de cultura foram centrifugadas para sincronização da infecção, conforme descrito na metodologia. Tratamentos com bacteriófagos (multiplicidade de infecção [MOI] 10) foram realizados em diferentes tempos pós inóculo (p.i.; 0min, 30min e 60min). Após um total de 90' p.i. de incubação à 37°C, as células foram lavadas três vezes com solução balanceada de sais de Earl (EBSS) e receberam MEM com 50 µg/ml de gentamicina. Seguiu-se nova incubação por 60min a 37°C, onde as bactérias extracelulares foram eliminadas. Ao fim desse período as células foram lavadas novamente com EBSS, lisadas com Triton X-100 0,1% (5-10min, 37°C) e mantidas no gelo. Cada amostra foi filtrada individualmente em filtro 0,22µm esterilizado e as bactérias foram recuperadas do filtro. Foram então diluídas e plaqueadas em meio ágar de soja tríptica (TSB) e, após incubação a 37°C durante a noite, as unidades formadoras de colônias (CFU) foram determinadas. As CFUs nos tratamentos foram comparadas com um controle que não recebeu bacteriófagos, através do teste estatístico ANOVA com um critério. Foram considerados significantes valores de $p \leq 0,01$. A verificação da ausência de contaminação cruzada foi realizada através de um controle que não recebeu bactérias.

3.11.2. Ensaio da atividade bactericida em ambiente complexo. Foi coletada água de esgoto (SANASA, Campinas) que por sua vez foi dividida em três alíquotas de 300ml. A primeira alíquota serviu como controle, sendo submetida às mesmas incubações das demais. As outras duas alíquotas foram enriquecidas com 10^8 CFU de *Shigella flexneri*, incubadas por uma hora a 37°C e, após esse período, uma delas recebeu um inóculo de

bacteriófagos (MOI 10). As alíquotas foram incubadas por 24 horas, a 37°C, sob agitação. Foram colhidas alíquotas e realizados plaqueamentos, em ágar McConkey e SS, em triplicata, nos tempos 0, 2, 4, 8 e 24 horas, das três alíquotas de água. Observamos a cinética das populações de *Shigella* durante esse período.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Metodologias de isolamento e caracterização de bacteriófagos líticos

A ampliação da amostragem de bacteriófagos é uma temática interessante e importante para estudos, dada a enorme diferença entre a quantidade estimada de bacteriófagos no planeta e a quantidade descrita e caracterizada, conforme discutido na introdução. O isolamento de amostras de regiões distintas, sucedido por caracterizações das mesmas, ampliará o entendimento sobre diversidade viral o que permitirá confirmações e/ou reformulações de conceitos gerais sobre bacteriófagos. Em decorrência, estas revisões e/ou reafirmações trarão implicações para temáticas diversas como ecologia e evolução, conforme exposto previamente. Estudos básicos nesta área do conhecimento são, portanto, necessários e a adaptação de metodologias para isolamento e caracterização representa o passo inicial neste sentido.

Os protocolos de isolamento e plaqueamento empregados para o isolamento de fagos foram adaptados com sucesso. O protocolo de isolamento a partir de água de esgoto foi aplicado em três ocasiões distintas e apresentou resultados excelentes em todas elas. Partindo de água de esgoto, utilizando a metodologia proposta, foi possível a obtenção de um concentrado de bacteriófagos, que permitiu o isolamento de vírus individuais por até um ano. Estes concentrados forneceram todos os vírus estudados neste trabalho (detalhados no item 4.2).

O protocolo de plaqueamento foi empregado inúmeras vezes, utilizando ambas as variantes para fins específicos, conforme descrito no item 3.4. A utilização deste protocolo, partindo do concentrado inicial de vírus, confrontado com as diversas bactérias propostas, permitiu a obtenção de placas de lise contra todas as espécies testadas, exceto *Acinetobacter*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*. O isolamento de fagos contra *Staphylococcus* e *Streptococcus*, embora teoricamente possível, não era muito provável visto a necessidade da presença de algum hospedeiro potencial para persistência dos vírus e a predominância de enterobactérias no ambiente de esgoto (Withey *et al.*, 2005). Estes fagos talvez sejam mais facilmente encontrados em ambientes alternativos, como secreções corporais ou esgoto hospitalar. Bactérias oportunistas como *Acinetobacter* e *Pseudomonas* a princípio também poderiam habitar o esgoto comum, mas

sua capacidade de habitar oportunamente ambientes seqüestrados provavelmente reflete um menor potencial competitivo destas espécies em locais de escassez de recursos, como o esgoto comum. Um ambiente como esgoto hospitalar, provavelmente submetido constantemente a pressões de seleção com antibióticos e desinfetantes, talvez favoreça mais o florescimento destes gêneros, e conseqüentemente de seus fagos. O isolamento de fagos de *Enterococcus* era esperado e sua ausência talvez decorra da ausência ou baixa prevalência de fagos nos materiais de coleta, ou na necessidade de outras linhagens desta bactéria para isolamento viral mais compreensivo. É possível que o título dessa bactéria no local de isolamento seja transiente temporalmente, dificultando a sobrevivência de seus fagos e mantendo-os abaixo do nível de sensibilidade do protocolo de isolamento empregado neste estudo. O enriquecimento prévio do esgoto com estas diferentes bactérias, provavelmente permitiria a amplificação de bacteriófagos transientes e/ou com títulos muito baixos e representa uma alternativa nestes casos.

Ainda assim, inúmeras placas de lise foram obtidas e o critério de seleção de amostras para propagação envolveu limpidez e tamanho da placa de lise, características associadas a um bacteriófago lítico. Merece destaque especial o isolamento de bacteriófagos líticos contra *C. violaceum*, inédito na literatura. Foi empregada para tal fim uma linhagem bacteriana não produtora do pigmento violaceína, visto que a difusão desse pigmento pelo ágar semi-sólido interfere na obtenção e/ou visualização de placas de lise.

A propagação dos fagos, contudo, apresentou resultados muito diversos. Trata-se de uma abordagem puramente empírica, uma vez que os fagos isolados apresentam características distintas de replicação. Nosso objetivo atingido, contudo, foi o estabelecimento de um protocolo generalista, que oferecesse condições gerais, permitindo adaptações individuais para cada vírus isolado. Ainda assim, os fagos isolados contra *E. coli*, por exemplo, não puderam ser propagados adequadamente e foram perdidos durante as primeiras passagens em cultura.

A repetição dos protocolos de plaqueamento e propagação, no mínimo três vezes, com o isolamento de placas de lise individuais em cada repetição, foi suficiente para garantir o isolamento de bacteriófagos individuais (conforme mencionado no item 3.4). As dificuldades encontradas em certos casos puderam ser atribuídas a diferenças drásticas entre tamanho das placas de lise sendo que as placas pequenas foram encobertas por placas

maiores. Sendo característica de ambas a limpidez, as placas pequenas tornaram-se imperceptíveis. No entanto, a separação destas amostras foi bem simples e as análises genética e morfológica apontam tais contaminações sem margem para dúvidas. Todas as preparações de bacteriófagos contendo mais de um vírus foram submetidas à separação. Contudo, problemas experimentais atrasaram a repetição dos protocolos de caracterização de algumas amostras, conforme discutido abaixo.

A estocagem dos fagos isolados também é um ponto sensível, sujeito a enormes variações. Dada a considerável diversidade estrutural apresentada por estes vírus não é surpresa a diferença de condições necessárias para manutenção da estabilidade dos mesmos. Optamos por manutenção no sobrenadante de lisados brutos, a 4°C, com reativações periódicas dos estoques. Esta abordagem, empregada com sucesso em diversos laboratórios com os quais obtivemos contato como, por exemplo, o Laboratório de Bacteriologia Veterinária da UFRGS, coordenado pelo Prof. Dr. Marcos José Pereira Gomes, apresentou-se satisfatória na maioria dos casos. Ainda assim, houve problemas na estocagem de fagos de *K. pneumoniae*, *S. enterica* e *Y. enterocolitica*, o que resultou na perda de diversos fagos isolados. Por outro lado, conforme mencionado anteriormente, outros fagos de *Y. enterocolitica* permaneceram estocados por aproximadamente um ano com fácil reativação dos mesmos após este período. A manutenção da viabilidade e estocagem durante longos períodos de tempo é uma característica muito importante, particularmente para fagos com potencial utilização terapêutica. Sendo assim, foi dada ênfase a fagos que se mantiveram estáveis e infectivos durante longos períodos de estocagem.

Apesar destas dificuldades, foram isolados, com base em três purificações de água de esgoto, ao menos 20 bacteriófagos distintos. Todos foram propagados em culturas laboratoriais e mantidos de forma satisfatória, tendo sido submetidos a caracterizações biológicas e moleculares. Seus títulos permaneceram estáveis durante todo o projeto, com poucas exceções.

A taxonomia de bacteriófagos se baseia em três fatores principais, que são morfologia do capsídeo viral, tipo de material genético e especificidade de hospedeiros (Nelson, 2004). Procedemos a estas análises, portanto, adaptando protocolos para obtenção e descrição destas características.

O protocolo para verificação de especificidade de hospedeiros foi aplicado com sucesso em todas as amostras isoladas, e repetidas vezes, em casos específicos, para confirmação de resultados. O tamanho das placas de lise foi avaliado em diversos graus, variando de ausência à lise pronunciada. Estabelecemos uma escala própria explicitada na legenda da Tabela I.

A análise morfológica exigiu um passo adicional de purificação, para eliminar restos bacterianos, conforme mencionado anteriormente. A purificação em colchão de sacarose (25-30%) forneceu a eliminação da maioria dos contaminantes em todos os casos, permitindo a visualização das amostras. Amostras de bactérias crescidas em BHI, contudo, apresentaram maior prevalência de restos celulares após a purificação, mas mesmo nestes casos não houve interferência demasiada na visualização dos bacteriófagos. O protocolo de preparação das telas de microscopia, utilizando coloração negativa por acetato de uranila, mostrou-se mais adequado e foi empregado em todos os casos, permitindo a análise morfológica observada nas Figuras 1, 2 e 3. As amostras preparadas com este corante apresentaram melhor contrastação e visualização mais fácil de detalhes estruturais do que as preparadas com PTA.

A análise genética foi realizada posteriormente a análise morfológica. Esta última forneceu indícios da presença de DNA fita dupla nos capsídeos virais. A aplicação do protocolo rápido de extração permitiu a observação dos genomas virais. Todos os genomas avaliados foram de alto peso molecular o que dificultou a determinação acurada do tamanho e do peso molecular destas moléculas de DNA. Tentativas de adaptar o protocolo rápido para análises do mapa de restrição, permitindo a determinação mais acurada do tamanho dos genomas virais não foram bem sucedidas devido às impurezas decorrentes do protocolo experimental. Sendo assim, foi empregado o protocolo de extração utilizando fenol, descrito no item 3.10.3. Este método se mostrou adequado para todas as análises necessárias, conforme demonstrado no próximo item.

As técnicas de análise de atividade biológica apresentaram bons resultados em culturas de células, mas resultados não conclusivos em ambientes complexos como água de esgoto, conforme será discutido. Ainda assim, ambas as alternativas são válidas para avaliação de atividade bactericida em sistemas mais complexos e mais próximos da

realidade, permitindo o vislumbre de situações diferentes às encontradas convencionalmente em tubos de ensaio e estimulando estudos posteriores.

4.2. Bacteriófagos líticos isolados

Conforme mencionado anteriormente, foram isolados e caracterizados ao menos 20 bacteriófagos líticos contra a maioria das bactérias testadas. Não há relatos na literatura, em nosso conhecimento, de estudos focados em bacteriófagos de esgoto na América Latina e os demais estudos desta área estão restritos a revistas com distribuição pouco difundida. Os poucos estudos de bacteriófagos já empreendidos no país geralmente restringem-se a fagos de gêneros ou espécies definidas, contribuindo em menor grau para estudos de prevalência e diversidade. Dessa forma, o presente estudo representa o primeiro passo na exploração da biodiversidade de bacteriófagos a nível nacional.

Não existe uma norma de nomenclatura para bacteriófagos e o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV) reconhece como nomenclatura letras, números e algarismos diversos (Ackermann e Abedon, 2000). Para identificar os bacteriófagos isolados neste estudo foi adotada uma norma de nomenclatura sugerida na literatura, mas não adotada oficialmente (Ackermann e Abedon, 2000). Esta norma consiste em nomear o fago utilizando os dois primeiros caracteres do gênero da bactéria hospedeira e os dois primeiros caracteres da espécie da mesma, seguido de um número para diferenciar isolados independentes. Esta nomenclatura permite associação rápida do vírus com seu hospedeiro e será a empregada adiante. As amostras que apresentaram fagos contaminantes receberam numerações distintas, envolvendo dois dígitos. A nomenclatura padrão será adotada nestes casos somente após análises complementares esclarecendo a possibilidade de contaminações cruzadas.

Após o isolamento e propagação *in vitro*, a primeira característica viral estudada foi a especificidade de hospedeiros. Esta já forneceu indícios da diversidade viral e permitiu a inferência de que a maioria dos isolados são vírus distintos entre si, dada a variedade obtida com estes resultados (Tabela I). A confirmação dos resultados foi realizada por repetição de amostragens aleatórias, utilizando preparações de fagos com títulos mais elevados.

Tabela I – Gama de hospedeiros dos bacteriófagos estudados

	Chvi1	Chvi2	Chvi3	Encl1	Saen1	Saen2	Saen3	Saen4	Shbo1	Shdy1	Shdy2	Shdy3	Shdy4	Shfi1	Shfi2	Shfi3	Shso1	Shso2	Yeen1	Yeen2
<i>A. baumannii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. violaceum</i> 599	++	++	++	++	+	-	++	++	++	++	++	++	-	-	++	++	++	++	++	+
<i>E. cloacae</i>	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-
EHEC O157H7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EPEC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i> (urina)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> 389	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. boydii</i> 03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-
<i>S. boydii</i> BS608	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. dysenteriae</i> 5862	+	+	+	++	++	-	-	-	++	++	++	++	++	++	-	+	+	++	-	-
<i>S. dysenteriae</i> 7172	+	+	++	++	++	++	-	-	++	++	++	++	++	-	+	-	+	++	++	+
<i>S. dysenteriae</i> 8135	++	-	+	+/-	+	+	-	-	++	+	++	++	++	++	+	+	+	++	++	+/-
<i>S. enterica</i> Typhi	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. enterica</i> Typhimurium UK1	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. flexneri</i> 17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+	++	-	-	+	+	+/-	++
<i>S. flexneri</i> 27	-	-	-	-	+/-	+/-	-	-	++	-	-	-	-	++	-	++	++	++	-	-
<i>S. flexneri</i> 37	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+	++	++	++	+	+	+/-	-
<i>S. flexneri</i> 67	-	-	-	-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++	-	-
<i>S. sonnei</i> 15	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	++	+/-	-	-
<i>S. sonnei</i> 17	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	++	++	++	-	-
<i>Y. enterocolitica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+

Legenda – (-): ausência de lise; (+): lise moderada ou pequena e nítida; (++): lise pronunciada; (+/-): lise irregular ou placas turvas, consideradas artefato da técnica; Os quadrados nas intersecções indicam o hospedeiro de isolamento do bacteriófago.

Um resultado interessante desta etapa foi a susceptibilidade da linhagem de *C. violaceum* utilizada neste estudo a diversos fagos isolados. Não há fagos descritos que utilizem esta bactéria como hospedeira e, portanto, não há estudos sobre a dinâmica deste organismo com vírus isolados do ambiente. Duas considerações decorrem de nossos resultados. É possível que a ação antiviral do pigmento violaceína (Andrighetti-Frohner *et al.*, 2003) represente um mecanismo ainda inexplorado de defesa contra bacteriófagos, e linhagens não produtoras deste pigmento estejam desfavorecidas em termos de predação

por vírus. A observação de atividade antiviral da violaceína contra o vírus herpes simplex tipo 1 (Andrighetti-Frohner *et al.*, 2003) pode representar uma evidência deste mecanismo de defesa contra fagos, visto que similaridades estruturais entre herpesvírus e fagos caudados foram recentemente reconhecidas (Bamford, 2003, Benson *et al.*, 2004).

Outra possibilidade seria a subestimação da capacidade de adaptação e/ou gama de hospedeiros dos bacteriófagos. Os fagos foram isolados a partir do esgoto municipal de Ribeirão Preto, SP, enquanto a bactéria hospedeira foi isolada do Rio Negro, no Amazonas, a milhares de quilômetros de distância. A permissividade a infecção implica em uma impressionante capacidade de adaptação do fago a outro hospedeiro em um local divergente de seu ambiente natural, ou ainda sugere uma gama de hospedeiros menos específica e mais generalizada, assegurando a potencial movimentação destes vírus entre biomas distintos, caso esta possibilidade se apresente. Ambas as sugestões trariam implicações importantes a estudos posteriores, sobre diversidade viral e potencial para transferência de informação genética por transdução.

A suscetibilidade de cepas de *S. dysenteriae* a diversos bacteriófagos também foi observada e merece destaque. Fagos isolados contra *C. violaceum*, *E. cloacae*, *S. enterica*, *S. boydii*, *S. flexneri* e *Y. enterocolitica* mostraram-se capazes de infectar e lisar, de maneira pronunciada, todas as cepas de *S. dysenteriae* empregadas neste estudo (Tabela I). É possível atribuir parte desta permissividade bacteriana a similaridades genéticas e metabólicas entre as enterobactérias residentes localmente. Ainda assim, essa informação reforça a proposta de uma capacidade de adaptação à ausência de hospedeiros naturais e/ou uma gama de hospedeiros mais ampla do que inicialmente proposto para certos bacteriófagos, com determinadas repercussões, conforme discutido previamente.

De maneira geral, nossos dados corroboram certas referências da literatura que apontam para gamas de hospedeiro mais amplas em fagos, principalmente os que habitam esgoto comum. Essas observações sugerem que as evidências clássicas em favor de hospedeiros restritos talvez tenham sido influenciadas por métodos de isolamento envolvendo enriquecimento de amostras e devam ser revistas (Withey *et al.*, 2005).

O passo seguinte envolveu a realização das análises morfológicas, que além de fornecer indícios de diversidade pode resultar em inferências sobre a composição genética viral. As amostras purificadas em sacarose foram visualizadas facilmente em microscopia

eletrônica, conforme observado nas Figuras 1, 2 e 3. Todas as morfologias observadas condizem com membros das três famílias de fagos que compõem a ordem *Caudovirales*. A Figura 1 mostra fagos com morfologia típica da família *Myoviridae*, apresentando cauda contrátil. A existência de partículas virais com diferentes comprimentos da cauda pôde ser verificada através da análise de campos diferentes da tela de microscopia (Fig 1B, 1F, 1G e 1J, por exemplo). Os fagos observados na Figura 2, com cauda longa e não contrátil, provavelmente representam membros da família *Siphoviridae*. Os fagos observados na Figura 3 apresentam morfologia típica dos componentes da família *Podoviridae*, com cauda bem curta, praticamente limitada a três fibras. Estes resultados suportam a prevalência de fagos caudados concordando com a dominância desta ordem de vírus em amostras ambientais. Conforme exposto anteriormente, 96% dos fagos caracterizados por microscopia apresentam esta morfologia de capsídeo e pertencem à mesma ordem de vírus (Ackermann, 2003, Gregoracci *et al.*, 2006). A variedade de morfologias observadas é uma evidência da diversidade viral sugerida por estudos de metagenômica (Breitbart e Rohwer, 2005, Hambly e Suttle, 2005) e condizente com observações de diversidade microbiana nestes ambientes (Withey *et al.*, 2005). A existência de tantos fagos distintos em um mesmo ambiente sugere uma diversidade concomitante de hospedeiros, ainda que temporalmente dinâmica, e/ou de nichos ecológicos diferenciados neste microambiente (Withey *et al.*, 2005), e incita reflexões sobre o valor acadêmico de estudos que compreendam a biodiversidade viral nestes ambientes.

Por fim, procedemos à caracterização genética das amostras. Com base na morfologia, foi inferida a presença de DNA fita-dupla nos capsídeos virais. A técnica de extração rápida (item 3.10.1) permitiu a confirmação dessa inferência e revelou contaminações de amostras com fagos distintos (Figura 4). Essas contaminações foram remediadas através de plaqueamento, e a separação foi confirmada pelo mesmo protocolo de extração rápida. A análise morfológica do fago Shdy2 revelou apenas uma morfologia, mas a análise genética demonstra a existência de dois genomas distintos (Figura 4). Provavelmente a amostra possui dois fagos com morfologias similares, mas com genomas distintos. A separação desses vírus foi complicada pela disposição similar das placas de lise, mas já foi realizada, embora a repetição da caracterização ainda esteja em andamento. As duas bandas observadas nos fagos de *Y. enterocolitica*, conforme discutido

anteriormente, representam também contaminação não detectada previamente. Sua separação também já foi concluída e a repetição das análises está em andamento.

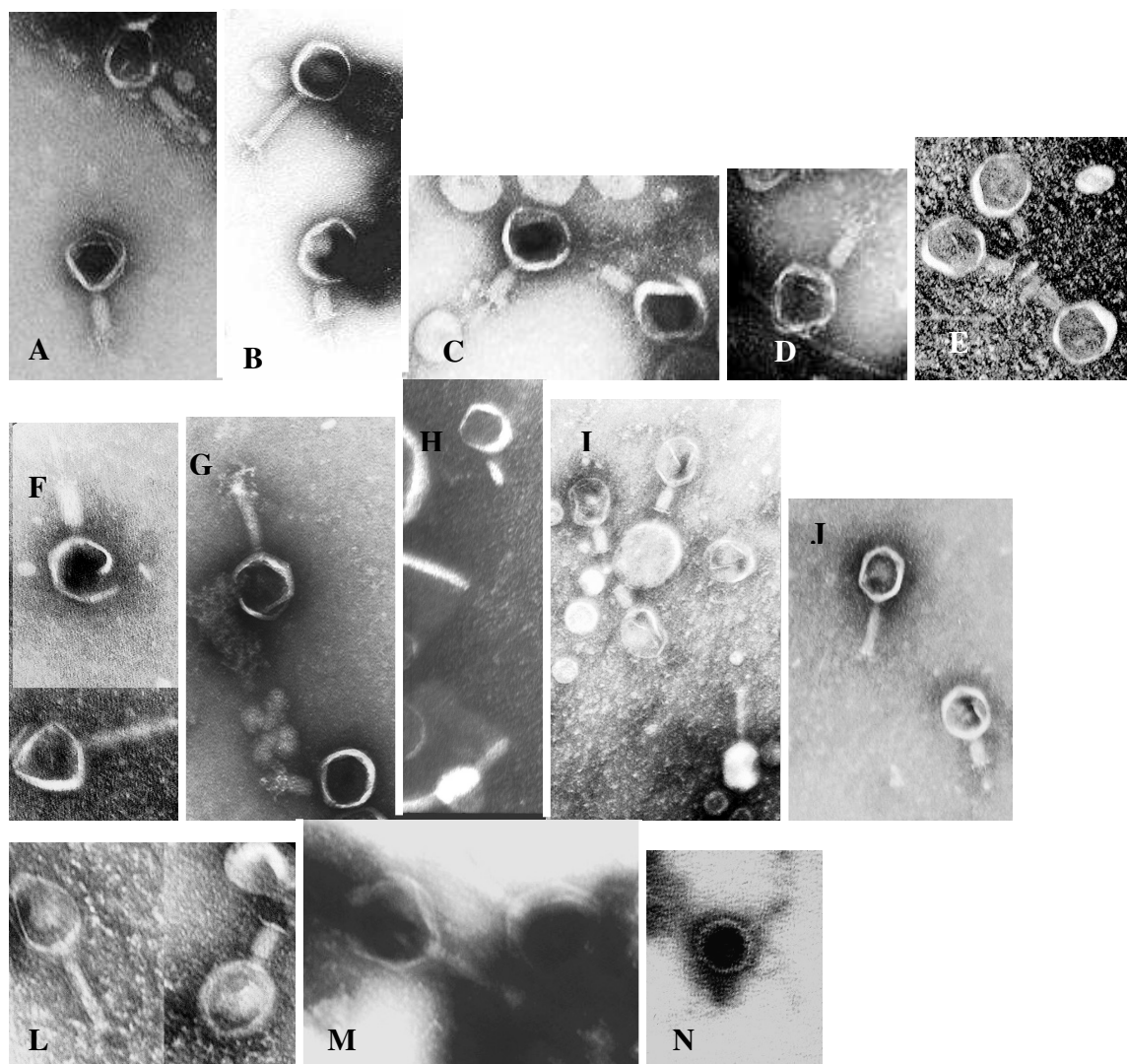


Fig 1 – Imagens digitalizadas dos negativos de microscopia eletrônica de transmissão; bacteriófagos com cauda contrátil, corados negativamente com acetato de uranila 2% (pH 4,5). **A)** Saen 2 (60000x); **B)** Shso 2 (60000x); **C)** Chvi 1 (60000x); **D)** Saen 4 (46460x) **E)** Encl 1 (60000x); **F)** Saen1 (60000x); **G)** Saen3 (60000x); **H)** Shbo1 (77500x); **I)** Shdy2 (46460x); **J)** Shfl3 (60000x); **L)** Shso1 (60000x); **M)** Yeen 1.1 (46460x); **N)** Yeen 1.2 (60000x);

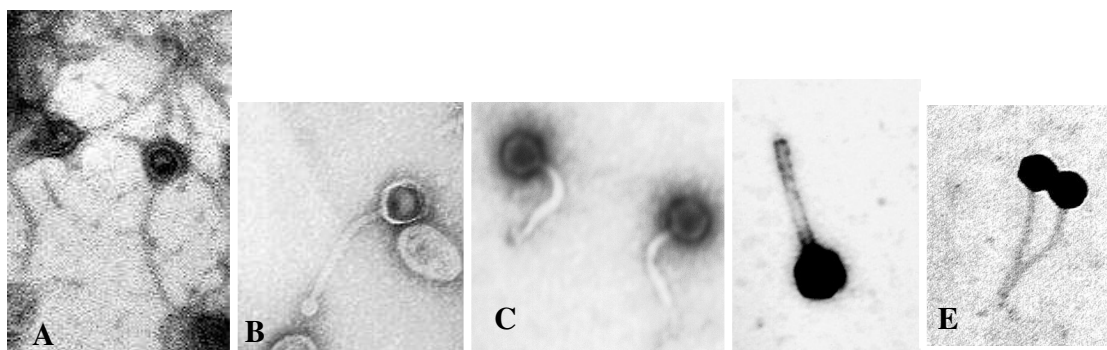


Fig 2 – Imagens digitalizadas dos negativos de microscopia eletrônica de transmissão; bacteriófagos com cauda longa não-contrátil, corados negativamente com acetato de uranila 2% (pH 4,5). **A)** Chvi 2 (60000x); **B)** Chvi 3 (60000x); **C)** Shdy4 (60000x); **D)** Yeen2.1 (60000x); **E)** Shfl 1 (24500x - aumento da foto não incluído);

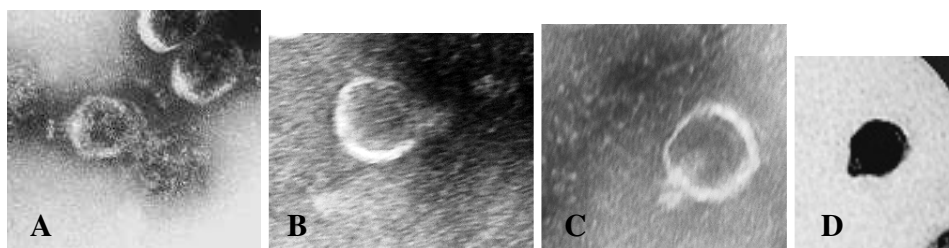


Fig 3 – Imagem digitalizada de negativo de microscopia eletrônica de transmissão; bacteriófagos com cauda curta, corados negativamente com acetato de uranila 2% (pH 4,5). **A)** Shfl2 (77500x); **B)** Shdy3 (77500x); **C)** Shdy1 (77500x); **D)** Yeen2.2 (60000x);

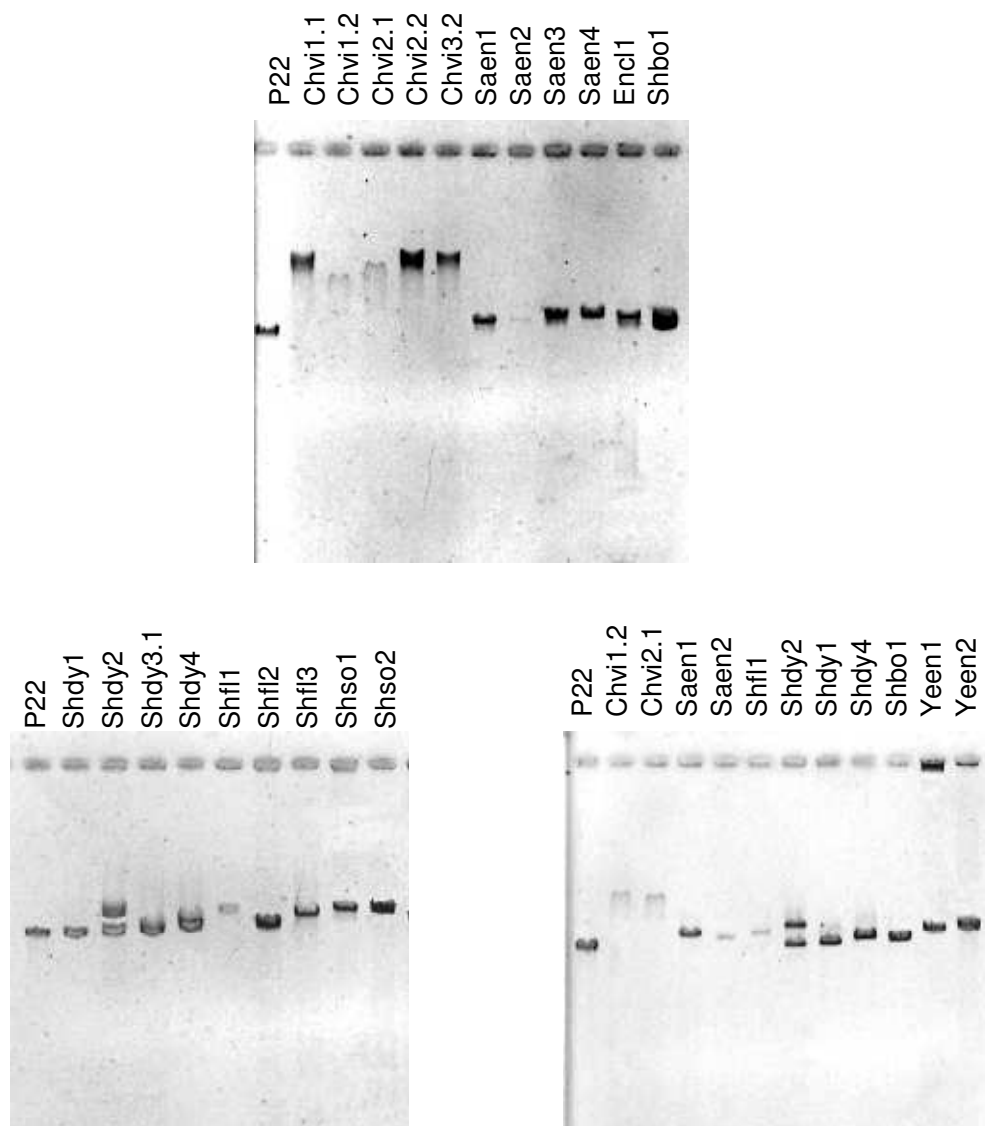


Figura 4 – Genomas de bacteriófagos extraídos pelo protocolo rápido (item 3.10.1); Corridas de 5h a 70V, em gel 0,7% de agarose; Para efeitos de comparação o genoma do fago P22 possui 41,724 nt;

A técnica de extração com fenol (item 3.10.3) permitiu, além da visualização dos genomas virais, a digestão das amostras com DNase e nuclease S1, necessárias para confirmação do tipo de material genético (Fig 5). Todos os ácidos nucleicos extraídos mostraram-se suscetíveis a DNase e resistentes a nuclease S1 (Fig 5) confirmando a inferência prévia de DNA fita dupla como material genético dos isolados.

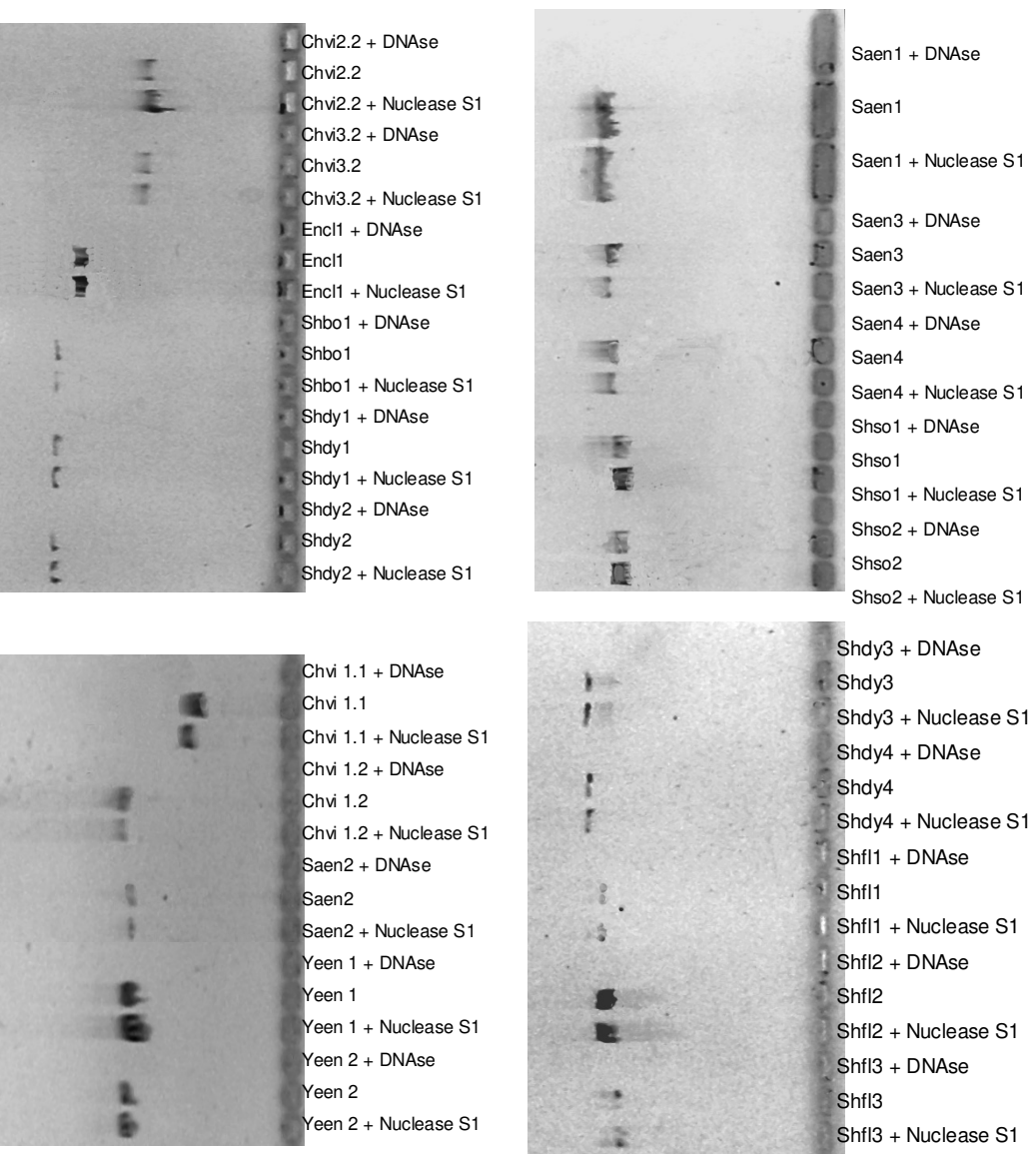


Figura 5 – Digestão enzimática, com DNase e nuclease S1, dos genomas virais extraídos pela técnica de extração com fenol (item 3.10.3).

Resumindo, podemos compilar os dados obtidos das caracterizações a fim de oferecer uma possível classificação taxonômica dos fagos isolados, conforme exposto na Tabela II.

Tabela II – Proposta de classificação taxonômica dos bacteriófagos

Amostra de Fago	Hospedeiro de Isolamento	Gêneros susceptíveis	Tipo de material genético	Morfologia	Classificação sugerida
Chvi 1	<i>C. violaceum</i>	<i>Shigella</i>	dsDNA	Icosaédrico; cauda contrátil	<i>Myoviridae</i>
Chvi 2	<i>C. violaceum</i>	<i>Shigella</i>	dsDNA	Icosaédrico; cauda longa	<i>Siphoviridae</i>
Chvi 3	<i>C. violaceum</i>	<i>Shigella</i>	dsDNA	Icosaédrico; cauda longa	<i>Siphoviridae</i>
Encl 1	<i>E. cloacae</i>	<i>Chromobacterium; Shigella</i>	dsDNA	Icosaédrico; cauda contrátil	<i>Myoviridae</i>
Saen 1	<i>S. enterica Typhimurium</i>	<i>Chromobacterium; Shigella</i>	dsDNA	Icosaédrico; cauda contrátil	<i>Myoviridae</i>
Saen 2	<i>S. enterica Typhimurium</i>	<i>Shigella</i>	dsDNA	Icosaédrico; cauda contrátil	<i>Myoviridae</i>
Saen 3	<i>S. enterica Typhimurium</i>	<i>Chromobacterium; Shigella</i>	dsDNA	Icosaédrico; cauda contrátil	<i>Myoviridae</i>
Saen 4	<i>S. enterica Typhi</i>	<i>Chromobacterium</i>	dsDNA	Icosaédrico; cauda contrátil	<i>Myoviridae</i>
Shbo 1	<i>S. boydii</i>	<i>Chromobacterium; Shigella</i>	dsDNA	Icosaédrico; cauda contrátil	<i>Myoviridae</i>
Shdy 1	<i>S. dysenteriae</i>	<i>Chromobacterium</i>	dsDNA	Icosaédrico; cauda curta	<i>Podoviridae</i>
Shdy 2	<i>S. dysenteriae</i>	<i>Chromobacterium; Shigella</i>	dsDNA	Icosaédrico; cauda contrátil	<i>Myoviridae</i>
Shdy 3	<i>S. dysenteriae</i>	<i>Chromobacterium; Shigella</i>	dsDNA	Icosaédrico; cauda curta	<i>Podoviridae</i>
Shdy 4	<i>S. dysenteriae</i>	<i>Shigella</i>	dsDNA	Icosaédrico; cauda longa	<i>Siphoviridae</i>
Shfl 1	<i>S. flexneri</i>	<i>Shigella</i>	dsDNA	Icosaédrico; cauda longa	<i>Siphoviridae</i>
Shfl 2	<i>S. flexneri</i>	<i>Chromobacterium; Shigella</i>	dsDNA	Icosaédrico; cauda curta	<i>Podoviridae</i>
Shfl 3	<i>S. flexneri</i>	<i>Chromobacterium; Shigella</i>	dsDNA	Icosaédrico; cauda contrátil	<i>Myoviridae</i>
Shso 1	<i>S. sonnei</i>	<i>Chromobacterium; Shigella</i>	dsDNA	Icosaédrico; cauda contrátil	<i>Myoviridae</i>
Shso 2	<i>S. sonnei</i>	<i>Chromobacterium; Enterobacter; Enterococcus; Shigella</i>	dsDNA	Icosaédrico; cauda contrátil	<i>Myoviridae</i>
Yeen 1.1	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Chromobacterium; Shigella</i>	dsDNA	Icosaédrico; cauda contrátil	<i>Myoviridae</i>
Yeen 1.2	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Chromobacterium; Shigella</i>	dsDNA	Icosaédrico; cauda contrátil	<i>Myoviridae</i>
Yeen 2.1	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Chromobacterium; Shigella</i>	dsDNA	Icosaédrico; cauda longa	<i>Siphoviridae</i>
Yeen 2.2	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Chromobacterium; Shigella</i>	dsDNA	Icosaédrico; cauda curta	<i>Podoviridae</i>

4.3. Testes de atividade biológica

Um dos primeiros bacteriófagos isolados que se mostrou promissor para uso terapêutico foi o fago denominado Shf11. Sua impressionante capacidade lítica pôde ser exemplificada por seu primeiro plaqueamento, tendo eliminado todas as bactérias na placa onde foi depositado. Este fago apresenta títulos altos, em geral superiores a 10^8 PFU/ml, e é bastante estável em propagações laboratoriais, além de possuir um ciclo replicativo bem curto. Foi utilizado também para quase todos os testes de caracterização biológica (item 4.2). Portanto, buscou-se estudar detalhadamente sua atividade em modelos biológicos complementares.

Primeiramente, objetivando o uso terapêutico, buscou-se estudar a dinâmica deste fago e de seu hospedeiro através do teste de infecção bacteriana de células eucarióticas em cultura. A terapia com fagos, conforme discutido anteriormente representa uma alternativa redescoberta recentemente, sendo digna de avaliações mais aprofundadas a respeito de sua viabilidade. Diversos estudos descritos na literatura abordam esta prática e enfocam aspectos interessantes desta alternativa terapêutica, sendo que alguns destes apresentam resultados muito encorajadores. Que é de nosso conhecimento, o estudo mais avançado neste sentido encontra-se em testes de fase II nos Estados Unidos, e propõe a utilização de um bacteriófago (ENB6) na terapia de infecções causadas por *Enterococcus faecalis* resistentes a vancomicina, infecções estas virtualmente intratáveis na atualidade (Bradbury, 2004).

Como primeiro passo para estudos terapêuticos, optamos por um ensaio utilizando células HeLa infectadas com uma linhagem invasiva de *S. flexneri*. Apesar de não mimetizar um ambiente *in vivo*, com um sistema imune funcional, este ensaio introduz níveis adicionais de complexidade, envolvendo novas variáveis dentro de um cenário terapêutico. O bacteriófago foi adicionado em diferentes momentos após o inóculo bacteriano e as bactérias intracelulares recuperadas após lise das células hospedeiras foram quantificadas. Houve redução significativa dos grupos tratados em relação ao controle ($p < 0,01$; Figura 6), mas não foi observada diferença estatística significativa entre os tratamentos. Estes resultados sugerem que o tratamento com fagos durante ou após a infecção é efetivo na eliminação bacteriana. Assim sendo, há observação de um efeito protetor e terapêutico que encoraja estudos posteriores sobre a utilização *in vivo* deste

bacteriófago com fins medicinais. Este ensaio também sugere o translado de vírus para o citoplasma eucariótico, mas é incapaz de determinar como o fago atravessa a bicamada lipídica, se por algum mecanismo direto de importação na membrana celular ou carreado por uma bactéria infectada que ainda não sofreu lise.

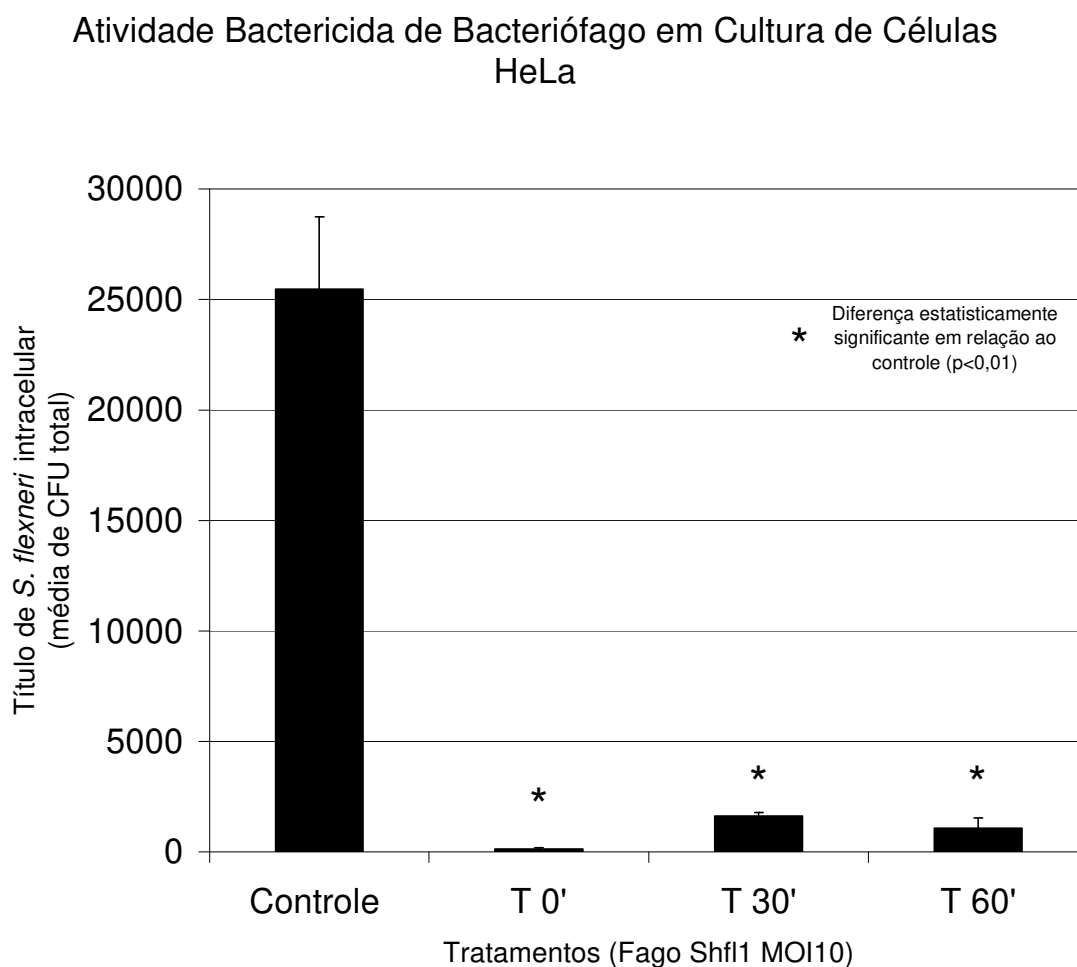


Figura 6 – Gráfico do ensaio de atividade bactericida do bacteriófago Shfl1 em cultura de células HeLa infectadas com *S. flexneri*; Recuperação de bactérias intracelulares, selecionadas com antibiótico, após três tratamentos com fago Shfl1 (MOI10) em tempos diferentes após inóculo bacteriano inicial de 10^8 CFU/ml;

Outro ensaio, desta vez visando a utilização do bacteriófago como agente de controle biológico de esgoto, foi empregado, com resultados pouco conclusivos, mas interessantes. Bacteriófagos representam uma alternativa inovadora em várias etapas do processamento de esgoto, a fim de favorecer certas populações bacterianas responsáveis por

processos metabólicos necessários para este processamento (Whitey *et al.*, 2005). O controle de patógenos transmissíveis por água contaminada representa outra proposta instigante de controle biológico (Whitey *et al.*, 2005) e dado o enfoque do presente trabalho em vírus de enteropatógenos, objetivou-se experimentar tal utilização. A emergência crescente de patógenos resistentes a cloro (Garret, 1995), principal mecanismo de eliminação destes no tratamento de esgoto, também implica em uma necessidade de alternativas para a eliminação destes agentes neste ambiente.

O objetivo deste experimento foi a verificação da redução da CFU de *S. flexneri* em um ambiente complexo como o esgoto comum. Esperávamos verificar a viabilidade desta prática, apesar da diversidade de outras bactérias e vírus neste ambiente, cuja composição é transiente e variável sendo determinada por diversos fatores (Whitey, 2005). O principal complicante deste experimento foi a excessiva carga bacteriana verificada no esgoto municipal de Campinas, em relação ao obtido em Ribeirão Preto. O experimento foi planejado com base nos títulos bacterianos verificados na segunda cidade, e mostrou-se inadequado para acompanhar a quantidade microbiana da primeira. Ainda assim, são possíveis algumas especulações com base nos resultados obtidos (Figura 7). Estes resultados indicaram que a dinâmica populacional bacteriana foi substancialmente alterada pela adição do fago, conforme esperado. A queda inicial observada após o enriquecimento do material com *Shigella* provavelmente se deve à competição por recursos, escassos no ambiente. É possível inferir que o tratamento com bacteriófagos acentuou a queda da CFU de bactérias lactose negativa (lac^-) e não produtoras de sulfeto de hidrogênio (H_2S^-) (observável por contagem em ágar SS), cuja maioria provavelmente é representada por *Shigella flexneri*, mas freou a queda de título de bactérias lac^- (observável por contagem em ágar McConkey), provavelmente representadas por outras espécies de Enterobactérias. Dado o enriquecimento com *Shigella*, é possível supor que esta bactéria tenha sido, num primeiro momento, predominante entre as colônias $\text{lac}^- \text{H}_2\text{S}^-$, e portanto tenha encontrado mais frequentemente o fago Shf11 no grupo tratado. A lise bacteriana liberou nutrientes que foram aproveitados por outras bactérias, conforme verificado por contagem em meio McConkey. Em um primeiro momento de competição exacerbada e escassez de recursos, isso teria promovido o aumento de título de bactérias metabolicamente similares a *Shigella*, visto que estas foram eliminadas por lise viral promovida pelo fago Shf11. Com o tempo,

um novo equilíbrio se instalou no ecossistema. Ainda assim, se essas suposições estiverem corretas, existe a possibilidade de promover a contenção de bactérias patogênicas utilizando o bacteriófago Shfl1. O ambiente, embora complexo e de composição indeterminada, não oferece empecilhos para o encontro de fagos com seus hospedeiros, desde que se utilize uma carga viral substancial. E a promoção do crescimento de outras bactérias não representaria problemas, desde que estas não sejam espécies igualmente capazes de causar patologia em humanos, uma vez que liberação de nutrientes decorrente da lise viral é esperada e favorecerá quaisquer microorganismos capazes de aproveitá-la. É necessário reforçar que estas observações são altamente especulativas, e um novo ensaio buscando abordar melhor a questão está em planejamento.

Atividade bactericida (Shfl1) em ambiente complexo

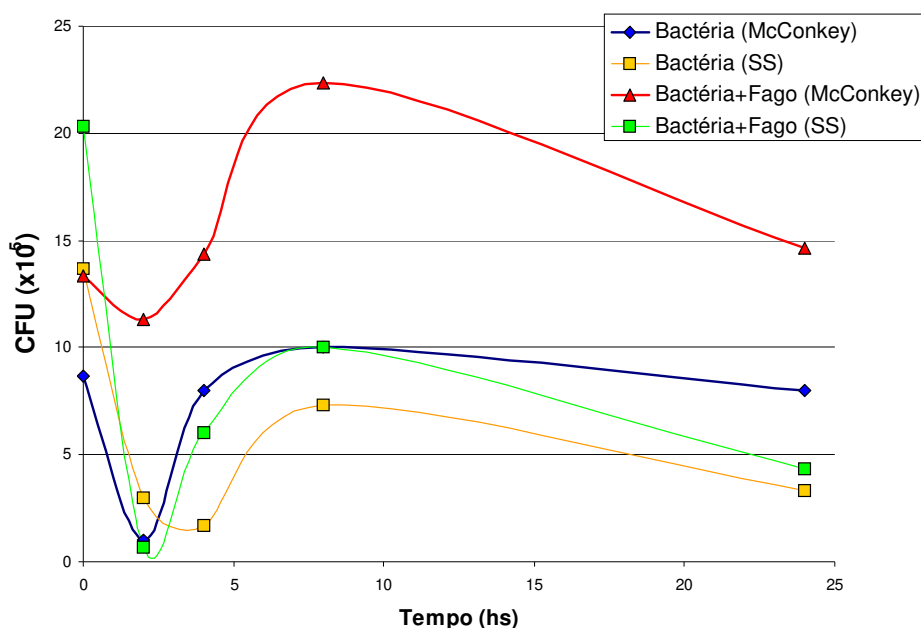


Figura 7 – Gráfico do ensaio de atividade bactericida do bacteriófago Shfl1 em água de esgoto enriquecida com *S. flexneri*; Recuperação de bactérias, em meios seletivos (McConkey e SS), em tempos diferentes durante incubação de 24h após inóculos bacteriano ou bacteriano e viral.

5. CONCLUSÕES

- Foi confirmada a potencialidade do isolamento de bacteriófagos líticos, a partir do esgoto, contra bactérias Gram negativas;
- Foram isolados ao menos 20 bacteriófagos líticos contra patógenos humanos, devidamente caracterizados e com sugestão de classificação taxonômica;
- Formou-se uma base para estudos nacionais sobre diversidade de bacteriófagos, com o estabelecimento inicial de um banco para estudos destes vírus;
- Os testes biológicos em culturas de células forneceram resultados encorajadores para posterior avaliação terapêutica *in vivo* do fago Shfl1;

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ACKERMANN, H.W.; ABEDON, S.T. **The Bacteriophage Ecology Group:** Bacteriophage names 2000. Disponível em: < <http://www.mansfield.ohio-state.edu/~sabedon/names.htm>>. Acesso em: 18 janeiro 2006.

ANDRIGHETTI-FROHNER, C.R.; ANTONIO, R.V.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; BARARDI, C.R.; SIMOES, C.M. Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 6, p. 843-848, set. 2003.

BACHRACH, U.; FRIEDMANN, A. Practical procedures for the purification of bacterial viruses. **Applied Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 706-715, out. 1971.

BAMFORD, D.H. Do viruses form lineages across different domains of life? **Research in Microbiology**, v. 154, n. 4, p. 231-236, mai. 2003.

BANNERT, N.; KURTH, R. Retroelements and the human genome: New perspectives on an old relation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 2, p. 14572-14579, out. 2004.

BENSON, S.D.; BAMFORD, J.K.; BAMFORD, D.H.; BURNETT, R.M. Does common architecture reveal a viral lineage spanning all three domains of life? **Molecular Cell**, v. 16, n. 5, p. 673-685, dez. 2004.

BISWAS, B.; ADHYA, S.; WASHART, P.; PAUL, B.; TROSTEL, A.N.; POWELL, B.; CARLTON, R.; MERRIL, C.R. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 1, p. 204-210, jan. 2002.

BRADBURY, J. "My enemy's enemy is my friend." Using phages to fight bacteria. **Lancet**, v. 363, n. 9409, p. 624-625, fev. 2004.

BREITBART, M.; MIYAKE, J.H.; ROHWER, F. Global distribution of nearly identical phage-encoded DNA sequences. **FEMS Microbiology Letters**, v. 236, n. 2, p. 249-256, jul. 2004.

BREITBART, M.; SALAMON, P.; ANDRESEN, B.; MAHAFFY, J.M.; SEGALL, A.M.; MEAD, D.; AZAM, F.; ROHWER, F. Genomic analysis of uncultured marine viral

communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 22, p. 14250-14255, out. 2002.

BREITBART, M.; ROHWER, F. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 278-284, jun. 2005.

BRÜSSOW H.; CANCHAYA, C.; HARDT, WD. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 3, p. 560-602, set. 2004.

CANCHAYA, C.; FOURNOUS, G.; CHIBANI-CHENNOUFI, S.; DILLMANN, M.L.; BRUSSOW, H. Phage as agents of lateral gene transfer. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 417-424, ago. 2003.

CARRERA, M.R.; KAUFMANN, G.F.; MEE, J.M.; MEIJLER, M.M.; KOOB, G.F.; JANDA, K.D. Treating cocaine addiction with viruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 28, p. 10416-10421, jul. 2004.

CASJENS, S.R. Comparative genomics and evolution of the tailed-bacteriophages. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 451-458, ago. 2005.

CHIBANI-CHENNOUFI, S.; BRUTTIN, A.; DILLMANN, M.L.; BRUSSOW, H. Phage-host interaction: na ecological perspective. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 12, p. 3677-3686, jun. 2004.

COMEAU, A.M.; KRISCH, H.M. War is peace – dispatches from the bacterial and phage killing fields. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 488-494, ago. 2005.

DABROWSKA, K.; SWITALA-JELEN, K.; OPOLSKI, A.; GORSKI, A. Possible association between phages, Hoc protein, and the immune system. **Archives of Virology**, set. 2005a.

DABROWSKA, K.; SWITALA-JELEN, K.; OPOLSKI, A.; WEBER-DABROWSKA, B.; GORSKI, A. Bacteriophage penetration in vertebrates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 1, p. 7-13. 2005b.

DAUBIN, V.; OCHMAN, H. Start-up entities in the origin of new genes. **Current opinion in Genetics & Development**, n. 14, v. 6, p. 616-619, dez. 2004.

DE ALMEIDA, R.; TREVILATO, P.B.; BARTOLETI, L.A.; PROENCA-MODENA, J.L.; HANNA, E.S.; GREGORACCI, G.B.; BROCCHI, M. Bacteriophages and insertion sequences of *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472. **Genetics and Molecular Research**, n. 3, v. 1, p. 76-84, mar. 2004.

FARUQUE, S.M.; ISLAM, M.J.; AHMAD, Q.S.; FARUQUE, A.S.; SACK, D.A.; NAIR, G.B.; MEKALANOS, J.J. Self-limiting nature of seasonal cholera epidemics: Role of host-

mediated amplification of phage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 17, p. 6119-6124, abr. 2005.

FILEE, J.; TETART, F.; SUTTLE, C.A.; KRISCH, H.M. Marine T4-type bacteriophages, a ubiquitous component of the dark matter of the biosphere. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 35, p. 12471-12476, ago. 2005.

FUHRMAN, J.A. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. **Nature**, v. 399, n. 6736, p.541-548, jun. 1999.

GARRET, L. **A próxima peste**: Novas doenças de um mundo em desequilíbrio. Tradução de Margarida Dorfman Black, Sonia Siessere e Marina Appenzeller. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1995. 708p. Título original: The coming plague.

GOODRIDGE, L.D. Bacteriophage biocontrol of plant pathogens: fact or fiction? **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 8, p. 384-385, ago. 2004.

GORSKI, A.; WEBER-DABROWSKA, B. The potential role of endogenous bacteriophages in controlling invading pathogens. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 5, p. 511-519, mar. 2005.

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

HAMBLY, E.; SUTTLE, C.A. The virosphere, diversity, and genetic exchange within phage communities. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 444-450, ago. 2005.

LAN, R.; REEVES, P.R. Escherichia coli in disguise: molecular origins of Shigella. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 11, p. 1125-1132, set. 2002.

LEVIN, B.R.; BULL, J.J. Population and evolutionary dynamics of phage therapy. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 166-173, fev. 2004.

LEVIN, B.R.; LIPSITCH, M.; BONHOEFFER, S. Population biology, evolution, and infectious disease: Convergence and synthesis. **Science**, v. 283, n. 5403, p. 806-809, fev. 1999.

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

LINDELL, D.; SULLIVAN, M.B.; JOHNSON, Z.I.; TOLONEN, A.C.; ROHWER, F.; CHISHOLM, S.W. Transfer of photosynthesis genes to and from *Prochlorococcus* viruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 30, p. 11013-11018, jul. 2004.

- LIU, M.; DEORA, R.; DOULATOV, S.R.; GINGERY, M.; EISERLING, F.A.; PRESTON, A.; MASKELL, D.J.; SIMONS, R.W.; COTTER, P.A.; PARKHILL, J.; MILLER, J.F. Reverse transcriptase-mediated tropism switching in *Bordetella* bacteriophage. **Science**, v. 295, n. 5562, p. 2091-2094, mar. 2002.
- MENARD, R.; SANSONETTI, P.J. Shigella flexneri: isolation of noninvasive mutants of gram-negative pathogens. **Methods in enzymology**, v. 236, p. 493-509. 1994.
- MERRIL, C.R.; BISWAS, B.; CARLTON, R.; JENSEN, N.C.; CREED, G.J.; ZULLO, S.; ADHYA, S. Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 8, p. 3188-3192, abr. 1996.
- MINAMISHIMA, Y.; TAKEYA, K.; OHNISHI, Y.; AMAKO, K. Physicochemical and biological properties of fibrous Pseudomonas bacteriophages. **Journal of Virology**, v. 2, n. 3, p. 208-213, mar. 1968.
- NELSON, D. Phage taxonomy: we agree to disagree. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 21, p. 7029-7031, nov. 2004.
- PEDULLA, M.L.; FORD, M.E.; HOUTZ, J.M.; KARTHIKEYAN, T.; WADSWORTH, C.; LEWIS, J.A.; JACOBS-SERA, D.; FALBO, J.; GROSS, J.; PANNUNZIO, N.R.; BRUCKER, W.; KUMAR, V.; KANDASAMY, J.; KEENAN, L.; BARDAROV, S.; KRIAKOV, J.; LAWRENCE, J.G.; JACOBS, W.R. JR; HENDRIX, R.W.; HATFULL, G.F. Origins of highly mosaic mycobacteriophage genomes. **Cell**, v. 113, n. 2, p. 171-182, abr. 2003.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning**: A laboratory manual. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. Vol 1, 2 and 3.
- SCHOOLNIK, G.K.; SUMMERS, W.C.; WATSON, J.D. Phage offer a real alternative. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 505-506, mai. 2004.
- SKURNIK, M.; STRAUCH, E. Phage therapy: Facts and fiction. **International Journal of Medical Microbiology**, in press. 2005.
- SMITH, H.W.; HUGGINS, M.B. Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. **Journal of General Microbiology**, v. 128, n. 2, p. 307-318, fev. 1982.
- SULAKVELIDZE, A.; ALAVIDZE, Z.; MORRIS, J.G. Jr. Bacteriophage Therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 3, p. 649-659, mar. 2001.
- SUMMERS, W.C. Bacteriophage Therapy. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 55, p. 437-451. 2001.
- SUTTLE, C.A. Viruses in the sea. **Nature**, v. 437, n. 7057, p. 356-361, set. 2005.

VAN REGENMORTEL, M.H.; MAHY, B.W. Emerging issues in viral taxonomy. **Emerging infectious diseases**, v. 10, n. 1, p. 8-13, jan. 2004.

WEBER-DABROWSKA, B.; MULCZYK, M.; GORSKI, A. Bacteriophages as an efficient therapy for antibiotic-resistant septicemia in man. **Transplantation Proceedings**, v. 35, n. 4, p. 1385-1386, jun. 2003.

WEINBAUER, M.G. Ecology of prokaryotic viruses. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, n. 2, p. 127-181, mai. 2004.

WEINBAUER, M.G.; RASSOULZADEGAN, F. Are viruses driving microbial diversification and diversity? **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 1-11, jan. 2004.

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.

Research Signpost
37/661 (2), Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India



Modern Bacteriophage Biology and Biotechnology, 2006: 1-36 ISBN: 81-308-0033-0
Editor: Grzegorz Węgrzyn

The biology of bacteriophages

**Gustavo Bueno Gregoracci, Wanderley Dias da Silveira
and Marcelo Brocchi**

Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, 13083-862
Campinas, SP, Brazil

Abstract

The dark matter of the biological universe. The main components of the virtual sea of viruses that wraps life up wherever it thrives. The most abundant biological entities on the whole planet. Such are the denominations given to these tiny viruses, which have been used only as molecular tools for a long time, but are now experiencing a so-called "renaissance". The focus of recent studies has changed from the biological tool to the entity that probably co-exists with its hosts in all niches where life is possible, through alleged billions of years of existence.

Correspondence/Reprint request: Dr. Marcelo Brocchi, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, 13083-862, Campinas, SP, Brazil
E-mail: mbrocchi@unicamp.br

This chapter is an attempt to summarize both classical knowledge and recent studies so as to integrate old concepts with new paradigms in our view of these viruses. Concepts such as morphology, replication strategies and taxonomy are intermixed with reflections on abundance, plasticity and ecology, covering subjects like nutrient cycling and lateral gene transfer. The employment of viruses as biological tools, both classical and recent, follows, with special emphasis on their therapeutic use as biological control agents of their prokaryotic hosts. Both theoretical issues and recent experimental data are discussed, in the light of recent publications in the field.

Summing up, a balanced survey of current information on bacteriophages is the aim of this chapter, hopefully including topics of interest to all who want to know more about phages.

Introduction

Bacteriophages, or simply phages, were discovered independently by Frederick William Twort and Félix Hubert d'Hérelle at the beginning of the 20th century. In 1915, Twort, a British pathologist working in London, described the existence of transmission particles in *Micrococcus* species while studying bacterial transformation, and proposed a number of hypotheses to explain this phenomenon. One of these hypotheses was that the agent of transformation was viral in nature. Félix H. d'Hérelle, a French Canadian working at the Pasteur Institute in Paris in 1917, observed the lysis of *Shigella* cultures in broth and clearly perceived the viral nature of the agent involved. In recognition of this fact, d'Hérelle coined the term bacteriophage for these agents, which literally means "bacteria eaters". Félix d'Hérelle dedicated his scientific life to the study of phage biology and introduced phage therapy for infectious bacterial diseases (reviewed by 1).

As with other viruses, phages are not considered life forms in their basic definition because they lack a cellular structure and organization. However, phages can infect and replicate in bacteria after binding to these cells. Phages are obligatory intracellular parasites that infect prokaryotes, including *Eubacteria* and *Archaea* (2,3), but the extent of their variation and diversity remain poorly understood (4,5). Phage virions may carry single-stranded (ss) or double-stranded (ds) DNA or RNA, exhibit different morphologies, and use different strategies for replication. About 96% of all bacterial viruses are tailed phages (*Caudovirales*), which are classified as *Myoviridae*, *Siphoviridae* and *Podoviridae*, based on the type of tail present (4). These tailed viruses are referred to as complex phages. Phages without tails are cubic (generally with an icosahedral symmetry), filamentous or pleomorphic.

Some phages are only able to trigger a lytic cycle of replication (virulent phages), whereas others, the so-called temperate phages, can “choose” between a lytic or a lysogenic state. Hence, the infection of a bacterial cell with a temperate phage can result in essentially two outcomes, namely, multiplication of the virion with lysis of the bacteria or lysogenization, in which the viral DNA is integrated into the bacterial chromosome (6). When the latter event occurs, the bacteria can acquire new traits. Indeed, the exchange of DNA mediated by phages (transduction) is one of the major mechanisms of lateral gene transfer (LGT) and recombination in bacteria. Recombination in particular has played an important role in bacterial evolution. Integrated viral genomes (prophages) confer to the bacterial host the ability to produce a variety of new traits, including virulence factors, that are generally transferred laterally en bloc to form “islands” of heterologous DNA in the new host (7,8,9,10).

Following their discovery, phages became a cornerstone in the early development of molecular biology, and several important biological phenomena were discovered using these organisms as research tools.

Basic characteristics of bacteriophages

Phage morphology

Although phages are similar to eukaryotic viruses in morphology and composition, they show marked morphological variation and have some particularities that are unique to phages. The capsid, or head, consists of a protein coat organized into capsomers, although these are rarely visible in phages (11). In most viruses, the capsomers consist of only one type of protein coat and are organized around the nucleic acid. The nucleic acid-protein complex packaged in the virus particle is known as the viral nucleocapsid. Phages may carry single- or double-stranded DNA or RNA as the genetic material. The *Cystoviridae* is the only phage family described so far that consists of viruses containing segmented dsRNA, and is also unique among bacteriophages. Few phages have envelopes, although the *Cystoviridae* consists of enveloped viruses. Some phages also contain lipids as part of the particle wall, and the presence of these molecules is accompanied by a low buoyant density and a high sensitivity to chloroform and ether (1,11).

Phage virions are tailed, cubic, filamentous or pleomorphic (Figures 1 and 2, reviewed by 1). Capsids with a cubic symmetry are icosahedral or of a related shape. The *Acholeplasma* virus MVL2 or L2 is a pleomorphic virus with an interesting particularity that is the absence of a capsid (1).

The tailed phages are the largest group of viruses known. This group is unique in morphology because of the presence of a tubular protein tail, which is a specialized structure for host recognition and the transfer of phage nucleic acid into bacteria. In tailed phages, the tail is associated with a cubic head of icosahedral symmetry, or elongated derivatives thereof. This organization has led to this group of phages being referred to as complex viruses (Figures 1 and 2). These phages have no envelope and usually consist of only protein and DNA, the latter being a single, linear, double-stranded molecule. Some tailed phages are able to establish only the lytic cycle and are referred to as virulent phages. Others, however, can “choose” between a lytic or a lysogenic cycle. In the latter case, the phage DNA is integrated into the bacterium genome as a prophage. Viruses that are able to establish a lysogenic cycle are known as temperate phages.

The prototype of a tailed phage is the T4 virus of *Escherichia coli*. This virus, which belongs to the family *Myoviridae* (see the next section for a discussion of taxonomy), has a characteristic contractile tail. T4 has almost 20 proteins in the tail, in addition to 40 or more proteins found in the phage coat. The tail contains specialized structures, including a collar, neck, fibers, base plate and spikes that are also found in other tailed phages (6). Figure 1 provides a schematic representation of the T4 morphology in which all of these structures are indicated. Electron micrographs of other tailed phages are also shown in this Figure.

Cubic, filamentous, and pleomorphic phages account for a minority (about 4%) of bacteriophages described so far. The filamentous phages, as suggested by their name, are helicoidal virions that in some cases resemble the tobacco mosaic virus (TMV). The filament can be rigid or flexible and

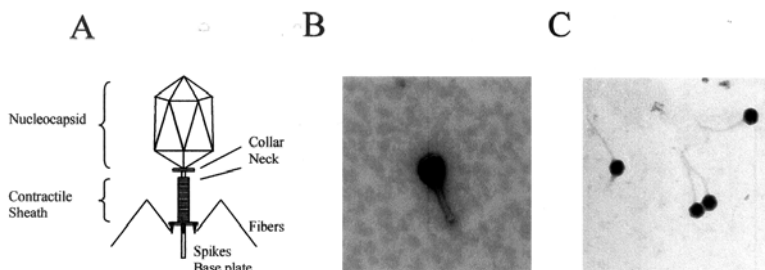


Figure 1. Basic structure of bacteriophages. A) Schematic representation of phage T4. The structures are indicated. Electron microscopy of negative stained bacteriophages obtained at our Laboratory: B) phage of *Enterobacter cloacae* (38000x) (*Myoviridae*); C) phage of *Shigella flexneri* (24000x) (*Siphoviridae*). Reproduced from (1) with permission.

variable in length (Figure 2). The nucleic acid can be ss or ds DNA, and there are examples of filamentous phages for the *Eubacteria* and *Archaea*. The life cycle may or may not be lytic. Details about the replication cycle of phages will be discussed in more detail later in this chapter. One of the most studied filamentous phage is M13. This virus infects *E. coli* but, in contrast to most other phages, M13 progeny are extruded from the host cells (12). The host cells are not lysed and may produce phages indefinitely. The cubic viruses contain ss or ds DNA or RNA as their genetic material. The pleomorphic phages are classified in the families *Plasmaviridae* and *Fuselloviridae*, although there are only a few examples of such viruses. These viruses contain a nucleocapsid with ds DNA and are restricted to the genera *Mycoplasma* of the *Eubacteria* domain (*Plasmaviridae*) and *Sulfolobus* of the *Archaea* domain. A schematic representation of all of these morphological types is shown in Figure 2.

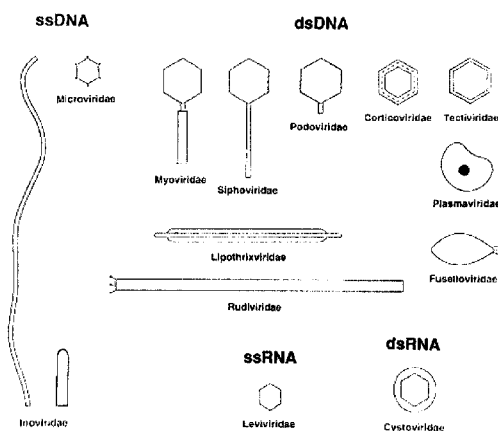


Figure 2. Schematic representation of major phage groups. Reproduced from (1) with permission.

Phage diversity and classification

Bacteriophages are one of the most (if not the most) abundant and diverse group of biological entities in nature. Our knowledge of this diversity is still in its initial stages. The difficulties in establishing artificial cultures of prokaryotes (often less than 1% of prokaryotes grow in culture) from natural sources have hampered the study of prokaryotic diversity and, since prokaryotic isolates are needed to isolate phages, this has also restricted the characterization of viral diversity. However, studies of phage

abundance in aquatic systems have shown that total viral abundance typically varies from $<10^4$ to $>10^8$ viruses/ml (13,14). The number of tailed phages in the biosphere is estimated to be $>10^{30}$, and phage particles outnumber prokaryotic cells by about 10-fold in environmental samples (4). These estimates are based on the classification of viruses according to morphological types, which represents only a gross characterization of this diversity. If one considers that viruses with the same or similar morphologies may differ in other characteristics, such as physiology and nucleic acid type and sequence, then the phage diversity is very likely much greater than currently believed. In addition, phages are a common constituent of the genomes of several cultivable prokaryotes (15). Recently, a new tool for genomic cloning, sequencing and analysis was developed and used to characterize the prokaryotic organisms present in ecosystems, without the need for culturing in the laboratory. This technique, known as “whole-genome shotgun sequencing” or “metagenomic analysis”, is based on the construction of genomic libraries using vectors that can carry DNA fragments as large as 200 kb (the vectors most frequently used for this are bacterial artificial chromosomes or BACs) to allow the cloning of DNA fragments extracted from aquatic, soil or host environments (reviewed by 16). In a remarkable study of this type done in the Sargasso Sea near Bermuda (17), the abundance of microorganisms was characterized by sequence analysis and genome annotation, and a considerable number of sequences belonging to phage genomes was found. This approach has also been used to analyze the viral community of human feces. Most of the sequences found in this study were unrelated to any sequence previously reported, and the community contained an estimated 1,200 viral genotypes (18). Overall, these observations indicate the existence of an amazing variety of phages in nature that remains largely uncharacterized.

The first taxonomic system for classifying phages was introduced by Félix H. d’Hérelle, who considered the existence of only one bacteriophage species with many races (1,19). Holmes classified phages as a suborder, a single family and a single genus of the order *Virales* (reviewed by 1). Lwoff, Horne and Tournier (20) further proposed a system of virus classification based on morphology and nucleic acid type. In general, the latter two characteristics are used to define a family. However, there are no universal criteria for defining genera and species. The International Committee for Taxonomy of Viruses (ICTV) uses several properties to classify viruses. This approach is referred to as the “polythetic species concept”, in which a species is defined by a set of properties, some of which may be absent in a given member (21). In its first report, the ICTV classified phages into six genera (22), but new phage groups have since

been added. *Caudovirales*, a new order for tailed phages that contains 15 new tailed phage genera, has recently been recognized (1).

By 1995, the ICTV had organized more than 4,000 animal and plant viruses into 71 families, 11 subfamilies, and 164 genera (21), and by 2000, an estimated 5,300 bacterial viruses had been examined by electron microscopy. Bacteriophages constitute the largest viral group. If one considers that phages outnumber prokaryotic cells by about 10-fold, then phages probably constitute an absolute majority of “organisms” on earth. Bacteriophages are currently classified in one order, 13 families, and 30 genera (Table 1). This classification is based on morphological, biochemical and serological characteristics and, more recently, on genomic structure and sequence analysis. This classification is constantly being reorganized and updated as new phages are identified and as new molecular tools are developed (5). The basic morphological properties of phages have been described above and are summarized in Figure 2.

The tailed phages (*Caudovirales*) are the most abundant in nature, and account for 96% of the phages described so far (1). These phages vary markedly in DNA content, composition and physiology, and are divided into three families defined basically by their type of tail. Phages of the family *Myoviridae*, which accounts for 25% of the tailed phages, have contractile tails that consist of a sheath and a central tube (Figures 1 and 2). This family includes phages T4, P1, P2, Mu, SPO1, and others. The family *Siphoviridae* (Figures 1 and 2) consists of phages with a long, non-contractile tail, and is the most abundant (61%). Examples of phages in this group include phages T1, T5, and L5. The *Podoviridae* are phages with short tails, and include T7, P22 and ϕ 29. The basic structure of these phages is shown in Figure 2. The 15 genera in the order *Caudovirales* have been defined based on genome structure, concatemer formation, the absence or presence of unusual bases, the presence of DNA or RNA polymerase, and overall DNA sequence. About 250 species are currently recognized (1,2). Tailed phages are associated with many groups of *Eubacteria* and with some groups of *Archaea*, but have not been found in the hyperthermophilic *Crenarchaeota*; those found so far are all associated with the *Euryarchaeota* (extreme halophiles and methanogens). Interestingly, no *Podoviridae* have been found in the *Archaea* (2). Nevertheless, the presence of tailed phages in all domains and in many groups of prokaryotes suggests that these viruses originated before the separation of the *Eubacteria* and *Archaea*, and are possibly as old as 3.5 billion years, which is close to the origin of life (1).

Viruses with polyhedral, filamentous and pleomorphic morphologies account for the remaining 4% of phages described so far. These groups are relatively rare and have narrow host ranges, being restricted to some groups of *Eubacteria* or *Archaea* (1,2,11).

The cubic or polyhedral viruses are classified into five families (*Microviridae*, *Corticoviridae*, *Tectiviridae*, *Leviviridae* and *Cystoviridae*) based on the same criteria mentioned above (Table 1). The basic morphology of these phages is shown in Figure 2. The genome is variable and consists of ss or ds DNA or RNA. The morphological peculiarities of the *Cystoviridae*, which contains one official member and two related phages (23), have already been discussed. The first virus to be described in this group is restricted to *Pseudomonas syringae* and has a capsid surrounded by a lipid membrane envelope, RNA polymerase, and a genome consisting of three molecules of ds RNA.

The filamentous phages are divided into three families: *Inoviridae*, *Lipothrixviridae*, and *Rudiviridae* (Table 1). The *Inoviridae* are ssDNA viruses that are organized into two genera, *Inovirus* and *Plectrovirus* (1,11).

Table 1. Classification and basic properties of bacteriophages.

Shape	Nucleic acid	Order and families	Genera	Examples	Members	Characteristics
Tailed	DNA, ds, L	<i>Caudovirales</i>	15		4950	
		<i>Myoviridae</i>	6	T4	1243	Tail contractile
		<i>Siphoviridae</i>	6	λ	3011	Tail long, noncontractile
		<i>Podoviridae</i>	3	T7	696	Tail short
		<i>Microviridae</i>	4	ϕ X174	40	
Polyhedral	DNA, ss, C	<i>Corticoviridae</i>	1	PM2	3?	Complex capsid, lipids
		<i>Tectiviridae</i>	1	PRD1	18	Internal lipoprotein vesicle
		<i>Leviviridae</i>	2	MS2	39	
	RNA, ss, L	<i>Cystoviridae</i>	1	ϕ 6	1	Envelope, lipids
		<i>Inoviridae</i>	2	ϕ d	57	Filaments or rods
Filamentous	DNA, ss, C	<i>Lipothrixviridae</i>	1	TTV1	6?	Envelope, lipids
		<i>Rudiviridae</i>	1	SIRV1	2	Resembles TMV
		<i>Plasmaviridae</i>	1	L2	6	Envelope, lipids, no capsid
Pleomorphic	DNA, ds, C, T	<i>Fuselloviridae</i>	1	SSV1	8?	Spindle-shaped, no capsid

Reproduced from (1) with permission.

The *Inovirus* are long, rigid or flexible filaments (Figure 2) and have been classified into 29 species that include the M13 phage of *E. coli* (1,11). The genus *Plectrovirus* contains short, straight rod phages (Figure 2). The progeny of inoviruses are extruded from the host cell that, after infection, produces new phage particles indefinitely (1). The *Lipothrixviridae* are dsDNA, rod-like phages with a lipoprotein envelope (Figure 2) and are confined to the genus *Thermoproteus* sp. of the *Archaea* (1,11). In contrast to the inoviruses, this group causes lysis of the host bacterium. The *Rudiviridae* are dsDNA viruses that resemble TMV and are restricted to thermophilic *Archaea*.

The pleomorphic group of phages is organized into two families with dsDNA, the *Plasmaviridae* and the *Fuselloviridae*. The first of these is restricted to *Mycoplasma* species and the second is restricted to *Sulfolobus* sp. (24). The morphology of these viruses resembles that of some pleomorphic viruses of eukaryotes (Figure 2).

Recently, the *Akamara* (Greek for “without chamber”) was proposed as a new biological domain, in addition to the already recognized “cellular” domains of *Eubacteria*, *Archaea* and *Eukarya*. The *Akamara* contains all acellular infectious agents that have a nucleic acid genome, including viruses (25), and was created partly to link viruses with the universal tree of life. In agreement with this, recent evidence suggests that viral DNA is at the origin of eukaryotic replication proteins (26). Figure 3 shows a tentative classification of phage T4 based on this new proposal.

Phage biological cycles

The ubiquity and diversity of bacteriophages and their prokaryotic hosts is reflected in the existence of diverse biological cycles. The high specificity of phages, together with their ecological niches and the metabolic variability of their hosts, provide a wide range of possibilities for replication. However, in practice, this range is likely to be limited by high constant selective

DOMAIN	<i>Akamara</i>
KINGDOM	<i>Euviria</i> (true viruses)
PHYLUM	<i>Deoxyribovira</i> (DNA viruses)
CLASS	dsDNA
ORDER	<i>Caudovirales</i>
FAMILY	<i>Myoviridae</i>
GENUS	<i>T4-like viruses</i>
SPECIES	<i>Enterobacteria phage T4</i>

Figure 3. Classification of phage T4 based on the recent proposed new domain *Akamara*, based on phage taxonomy described in (3).

pressure and the modular nature of these viruses. Since a detailed discussion of bacteriophage replication is beyond the scope of this section, only general principles and classic schemes of replication will be considered here, and further details can be found in the next section.

The first phages isolated by D’Herelle and Twort were recognized for their marked lytic capability against their bacterial hosts. Later, in 1921, Bordet, Ciuca and Gildmeister discovered bacteria capable of generating bacteriophages (lysogenic). Lwoff reviewed the concepts and defined the terms lysogeny and pseudolysogeny (carrier state) (27). A state of chronic infection was recently recognized following the characterization of lysogenic bacteria that produced active phage titers. These terms

encompass the classic definition of several phage life cycles, although this definition is possibly an oversimplification (3).

The stages of infection by phages generally include adsorption, uncoating, nucleic acid replication and protein expression, and virion assemblage, release and transmission (28). However, there are certain particularities specific to each biological cycle.

Adsorption is the first stage of infection and is common to all bacteriophages. After initial contact, the phage usually binds reversibly to a receptor in the prokaryotic cell, in a temperature-independent manner. The next step involves irreversible binding between the phage and the host, and determines the beginning of the infection if the cell is permissive; in most cases, this event is temperature-dependent (3,29). This restriction on permissiveness is necessary because some theories postulate that certain bacteria express receptors for phages even when they are not permissive and/or possess antiphage mechanisms, which allow them to use these viruses as a source of nutrients (phosphorous, nitrogen and organic carbon) in environments where these nutrients are scarce (3,30). The dependence on temperature implies the involvement of an enzymatic process, as discussed below.

Theoretically, any structure exposed by the bacterium can be used as a phage receptor. In Gram-negative bacteria, there is experimental evidence for the use of LPS (lateral and basal chains of the molecule) and outer membrane proteins. In Gram-positive bacteria, complexes involving peptidoglycans (with teichoic acids, C-carbohydrates and other structures) have been implicated, in addition to surface and plasma membrane proteins. Other surface structures can also be recognized by phages, including flagella, pili and possibly capsule components in some cases (29).

Viral adsorption is followed by the uncoating stage in which the viral genetic material is expelled from the capsid. The capsid generally does not penetrate the host cell (3), thereby eliminating the capsid penetration stage that exists in other viruses, including most eukaryotic viruses. Nevertheless, there are RNA phages in which capsid uncoating occurs within the host cell (1). Most phages facilitate the entry of the genetic material through the action of enzymes associated with phage antireceptors. These enzymes make the bacterial cell wall penetrable and facilitate the transportation of genetic material into the cell (29).

From this point on, the differences among the replicative cycles are more apparent. Lytic phages immediately initiate the replication and expression of the genetic material, and direct most of the host's expression routes to the synthesis of their own components. This stage is followed by virion assembly and the accumulation of infectious particles within the

bacterium. The production of enzymes (holines and lysines) leads to weakening of the plasma membrane and the cell wall, eventually allowing lysis through increased pressure resulting from the accumulation of virions, with a consequent release of phages into the medium. Certain ssRNA phages, such as Q β , and some ssDNA phages, have genomes that are too small to carry lysines and have thus developed alternative strategies to weaken the cell wall, including the production of proteins that have the alternate function of interfering with cell wall synthesis, to produce the same lytic effect as enzymes (31).

Lysogenic phages also have the same “option” of initiating the replication of genetic material and protein expression, and therefore entering the lytic cycle. However, in certain situations, such as host scarcity, these phages can integrate their genetic material into the host genome and repress all or most of the genes that are unnecessary for the maintenance of lysogeny. Complex molecular mechanisms (see next section) are generally involved in the control of the genetic switch between lysis and lysogeny, but interaction with the host’s cellular components also influence the “choice”. Factors related to the metabolic status of the host predominate in this interaction and indirectly favor the lytic cycle when the cell is metabolically active, or the lysogenic cycle in unfavorable situations. In the lysogenic state, the phage genetic material, or *prophage*, is replicated passively together with the host genome and confers immunity to similar phages through mechanisms involved in the maintenance of lysogeny. This is a reversible state, with adverse conditions such as damage to bacterial DNA resulting in the *induction* of prophages, in promotion of the lytic cycle and consequently the death of the bacterial host.

Pseudolysogenic phages promote persistent infections in which expression of the genetic material occurs in only a fraction of the infected cells. The term carrier state, commonly used as a synonym, refers more properly to plasmid-like phages. Two important aspects of this state are the lack of insertion of the phage genetic material into the hosts, in contrast to the lysogenic cycle, and the fact that not all infected cells are lysed, thus differing from the lytic cycle. This condition can result from unsuccessful infection in most of the population, perhaps because of limited availability or enzymatic destruction of appropriate receptors, or from immunity involving superinfection by a lysogenic phage that mutates frequently to a lytic cycle. These phenomena suggest that pseudolysogeny may be a common name for a variety of bacteriophage cycles. Finally, the biological cycle of chronic infection is characterized by the continuous release of small amounts of phages that are liberated by extrusion or budding, without cell lysis (31).

The transmission step, also known as the extracellular search stage, completes the cycle. This is probably the most time-consuming stage of the phage replicative cycle and depends on the host availability and other characteristics of the environment in which they are located. Most phages do not complete this stage and perish without a successful infection (3,30). However, the few that manage to successfully infect a permissive host are responsible for maintenance of the viral population. Because they lack structures for motility, phages rely on passive diffusion in liquids and semi-solid fluids and/or Brownian movement in liquids for the initial contact required for adsorption (3,28). Alternatively, it is possible to the phage to lay motionless waiting passively for contact resulting from multiplication and/or motility structures of the host. After contact and adsorption to a receptor, if any, the cycle starts again. Figure 4 summarizes the different biological cycles.

Other parameters of replication frequently used to characterize viruses include the adsorption time, eclipse period (time necessary for reorganization of the cell machinery), latent period (time necessary for the production of intracellular viral particles) and burst size (amount of virions released per infected cell). All of these parameters can be measured only for phages in the lytic cycle, but are extremely variable, and depend on the metabolic activity and nutritional status of the host, as well as the individual characteristics of the phages. These parameters are obtained through one-step growth cycles, are common to many eukaryotic viruses and have been determined through studies of bacteriophages.

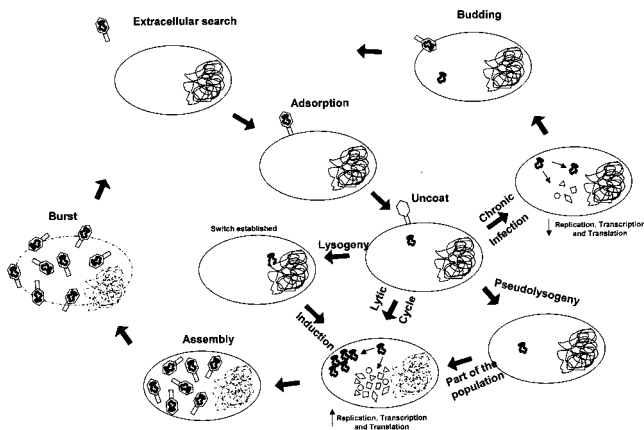


Figure 4. Bacteriophages biological cycles.

Phage genomes and regulation of gene expression

Basic properties

Bacteriophages may carry ss or ds DNA or RNA and, in the Baltimore system of classification, they are grouped in classes I to IV (32). As discussed above, the type of nucleic acid present in the virion is an important characteristic used for virus classification, and phage diversity is reflected by the variety of genome sizes, which range from barely 4 kb up to 600 kb. Indeed, bacteriophage G, a phage of *Bacillus megaterium*, contains one of the largest viral genomes described so far. Only recently, an amoboid virus known as Mimivirus was reported to have a genome larger than that of bacteriophage G (33). In tailed phages, DNA sizes vary from 17 to 600 kb (6). In general, phages with RNA genomes contain small molecules of RNA, usually ssRNA, with equally small nucleocapsids. This observation is also valid for phages with small DNA genomes (generally less than 10 kb). Phages with medium to large genomes (30 to 200 kb) generally have dsDNA (6).

A detailed description of the genome structure is beyond the scope of this section. Our intention here is to demonstrate the variability in genome types and sizes that correlates with the strategies used by phages to infect and replicate in their host. In the following discussion, we will consider the basic properties of the genomes of some RNA and DNA viruses of different complexities, and will end with a brief discussion of prophage genomes and their implications for bacterial hosts.

RNA bacteriophages are among the viruses with the smallest known genomes. The prototype of these viruses is the MS2 phage (*Leviviridae*) of *E. coli*. The MS2 genome consists of an ssRNA molecule 3,569 nucleotides long that acts directly as mRNA (RNA⁺) upon entering the cell. This small genome contains only four genes that code for the maturation protein, coat protein, lysis protein, and a subunit of RNA replicase. Hence, the replication and maturation of MS2 depends on many proteins coded by host genes. An interesting feature of the MS2 phage is that the lysis protein is coded by a gene that overlaps the coat and replicase protein genes (6,34). This phenomenon of overlapping genes is quite common in very small genomes such as that of MS2. Another interesting characteristic is how MS2 phages regulate gene expression. The strategy developed by this virus is an example of how secondary structures in mRNA can govern the translation process. In the case of MS2, the viral RNA is folded into a complex with extensive secondary structure. Of the four AUG start sequences, the most accessible to the translation machinery are those for the coat and replicase proteins, which are required in high concentrations. The presence of this secondary structure prevents binding to the AUG start

site of the gene for the lysis protein that is not expressed at the beginning of the infection. However, in late phases, as the number of coat protein copies increases in the cell, they bind near the AUG start site of the replicase protein, turning off the synthesis of this gene. In addition, the translation of this protein disrupts secondary structures, thereby making the start site of the lysis gene available for translation (6).

A number of small bacteriophages have genomes containing ssDNA. These viruses have a limited amount of genetic information in their genomes, in a manner similar to most RNA phages. Because of this genomic “simplicity”, phage replication and assembly depend upon the host machinery for gene expression and DNA replication. The prototype of these viruses is phage ϕ X174, which has a 5,386-nucleotide genome. This phage was an important tool in the early studies and discoveries that marked the beginning of modern genetics and molecular biology because its DNA genome was the first to be completely sequenced by Frederick Sanger and collaborators (35). This phage was also the first genetic element in which overlapping genes were described. A detailed analysis of the genetic map of ϕ X174 indicates the existence of 11 open reading frames (ORF) with several overlapping genes (32). Another particularity of ϕ X174 is the existence of a small protein (A*-protein) formed by the re-initiation of translation rather than transcription within the mRNA of gene A. The A protein is involved in the rolling circle replication that is characteristic of this virus while the A* protein is involved in the switching off of host DNA synthesis (32).

In contrast to phages with small genomes, there are the classic T coliphages, that contain dsDNA, such as phage λ . The T coliphages, all of which are tailed, form four groups: T1 (about 50 kb), T2, T4, and T6 (about 170 kb), T3 and T7 (about 40 kb), and T5 (about 130 kb). The members of each group have a similar virion morphology and can produce viable recombinants in mixed infections. The modular structure of phages resulting from recombination will be discussed later in this section. The increase in genome complexity seen in these phages correlates with a greater influence on and modulation of physiological processes in the host, although the primary aim is still the same as that of simpler phages, namely the generation of phage progeny. The genes in these viruses are organized to permit the temporal expression of genes according to the phase of infection, and it is possible to define the classes of genes as early, middle and late genes based on this expression. However, the regulatory circuits and mechanisms that control gene expression in these viruses are considerably more complex than for MS2. In general, the products of early and middle genes are involved in DNA replication and transcription whereas the late genes code for structural proteins and lysis factors (32).

The coliphage T7 is an example of this group. The T7 genome is a linear dsDNA molecule of 39,936 base pairs (bp) in which there are overlapping genes. The order of the genes on the T7 genome influences the regulation of gene expression and the process of infection. T7 injects DNA in a linear order from the “left end” to the “right end”. Consequently, genes at the “left end” gain access to the interior of the host cell first and are also transcribed first. These genes are transcribed by the cellular RNA polymerase core enzyme associated with the sigma S (σ^{70}) factor that governs the transcription of several housekeeping genes in *E. coli* and other bacteria (36). One of these early genes codes for a protein that inhibits the host restriction system, thereby permitting the initiation of infection. Two other early mRNA molecules code for proteins that stop the action of the host RNA polymerase. Another protein is a viral RNA polymerase, known as T7 RNA polymerase, that only recognizes T7 promoters and is responsible for the transcription of most of the T7 genes. This protein drives all of the biosynthetic machinery of the cell to produce new phage particles. The other T7 genes code for proteins involved in DNA replication and host lysis, phage structural components and maturation. Hence, the host RNA polymerase is used only to transcribe a few early genes, including the T7 polymerase. Both ends of T7 DNA have direct terminal repeats of 160 bp that are essential for the replication of this phage. Recently synthesized T7 DNA molecules contain single-stranded regions at each end, as a result of RNA primer degradation, and these ends are complementary to the same regions in the next molecule. The pairing between these single regions generates concatamers formed by a number of T7 DNA molecules that produce a larger DNA. The gaps are sealed by the action of DNA polymerase and DNA ligase. Continuous replication and recombination can lead to concatamers of considerable lengths. During encapsidation, a phage-encoded endonuclease cleaves concatamers at specific sites, resulting in the formation of virus-sized linear molecules with terminal repeats (37).

The genome of phage T4 is more complex. This phage has a dsDNA genome that is larger than that of T7 (about 170,000 bp), which means that many other phage factors interact with a number of host products. The T4 DNA encodes over 135 proteins and their temporal regulation allows the definition of early, middle and late proteins, according to the phase of infection in which they are expressed. Unlike T7, T4 does not encode a phage-specific RNA polymerase. Instead, a number of proteins produced by the phage sequentially modify the specificity of the host RNA polymerase in such a way that this protein recognizes promoter sequences and expresses phage genes in an ordered manner (6,38). The modulation of RNA polymerase specificity involves covalent modifications of the host enzyme or

the production of a phage-specific sigma factor that substitutes the host sigma factor in the holoenzyme.

An interesting feature of the T4 DNA is the existence of a unique base, 5-hydroxymethylcytosine, instead of cytosine. The hydroxyl groups of 5-hydroxymethylcytosine are glycosylated, making the modified DNA resistant to virtually all of the host's restriction endonucleases. In addition, the ends of DNA molecules from different T4 virions also contain different sequences. This phenomenon, known as circular permutation, is a consequence of phage replication and encapsidation. As with T7, the extremities of T4 DNA are characterized by the presence of direct repeats that are longer than those of T7, varying from 3,000 to 6,000 bp in length. These repeats are important for DNA recombination and concatamer formation, as in the case of T7. However, unlike T7, the T4 endonuclease does not recognize and cleave specific sequences during encapsidation. This enzyme cleaves head-full packages of DNA, regardless of the sequence. Each resulting molecule also contains slightly more than one complete copy of the entire genome. Together, these peculiarities explain the phenomenon of circular permutation.

The genomic analysis of temperate phages, such as phage λ (a bacteriophage of *E. coli*), indicates the presence of genes coding for proteins involved in integration and excision, in addition to genes associated with DNA replication and morphogenesis. There are also regulatory genes, the products of which govern the "choice" between the lytic and the lysogenic cycles. The λ DNA is a linear, double-stranded molecule of about 48 kb with a complementary, ssDNA 12 nucleotides long at the 5'-terminus (39). A number of genes encoding antiterminator factors that play important roles in the regulation of gene expression are also present. The establishment of lytic or lysogenic pathways is essentially governed by the balance between the products of the *cI* and *cro* genes. The former is the lambda repressor responsible for lysogeny and its maintenance, and its expression is under positive control by the protein CII, the product of the *cII* gene. This protein is unstable but can be stabilized by the phage-encoded protein CIII. Depending on the metabolic state of the host cell and the phage-to-bacteria ratio, *cI* is expressed and reaches levels that induce and stabilize the lysogenic pathway. The critical event that determines the "choice" between the two possible cycles is the concentration of CII, which activates CI expression.

After entering the host cell, λ DNA circularizes through annealing of the self-complementary single strands. The host RNA polymerase guides the production of RNA transcripts from a few promoters, including P_R and P_L . These yield transcripts that are translated to give the products of the *cro* and *N* genes. The latter is an antitermination factor that makes the P_R and

P_L transcripts longer, and leads to the expression of proteins encoded by genes *O*, *P*, *Q*, *cII* and *cIII*. Q protein is also an antiterminator that allows the expression of structural and lytic genes. High levels of the Cro protein block transcription from P_R and P_L . In this case, there is a downregulation of *cII* and *cIII* and the phage is committed to the lytic pathway. However, if CIII accumulates at the beginning of the infection, it stabilizes CII that in turn activates CI expression (by binding to the P_E promoter) and the expression of the integrative system. As a result, genes responsible for the lytic pathway, including *cro*, are downregulated, and the λ DNA is inserted into the host's chromosome.

The genomic organization of the DNA region responsible for *cI* and *cro* expression explains this fine-tuned regulation that is critical for commitment to the lytic or lysogenic pathway (Figure 5). These genes flank an operator sequence (O_R) that is subdivided into three regions denominated sites O_{R1} , O_{R2} and O_{R3} . The Cro regulator binds with decreasing affinity to sites 3, 2 and 1. CI also binds to these sites, but with the opposite order of affinity. The binding of Cro to O_{R3} inhibits CI expression and favors the lytic pathway. In contrast, the binding of CI to O_{R1} inhibits Cro, and the lysogenic cycle is favored. This genomic organization also allows the negative feedback regulation of each of these genes by the binding of Cro and CI to O_{R1} and O_{R3} , respectively. The P_E promoter is also indicated in Figure 5. CI expression is induced by CII through binding to this promoter (39).

Under optimal conditions, only a minority of the cells (about 10^4) in bacterial cultures enters the lytic cycle and produces virion particles, primarily because of stochastic fluctuations in early molecular events. In these situations, the CI protein inhibits the expression of Cro and the expression of other proteins responsible for the lytic pathway in most host cells. However, upon induction of the host's SOS response, induced to repair DNA damage caused by a number of stress conditions, such as through exposure to ultraviolet radiation, X-rays, treatment with DNA damaging substances or antibiotics, RecA protein (normally involved in

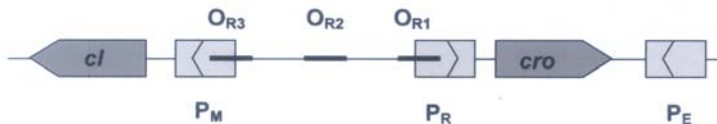


Figure 5. Genomic organization of *cro* and *cI* genes in phage λ genome. The O_R sites are indicated by bold traces. The P_M , P_R , P_E , *cI* and *cro* genes are indicated by boxes. The arrows indicated the direction of transcription.

genetic recombination, see later) is converted into a special type of protease that participates in the degradation of CI. When this occurs, Cro expression is induced and the protein accumulates, eventually inhibiting CI expression and favoring the lytic pathway (39).

There are two other types of lysogeny, besides that described for λ phage (i), namely, P1 type, with the persistence of phage DNA as a plasmid, but without integration (ii), and Mu type, with random integration mediated by a transposase (iii) (1). The peculiarity of the P1 type has already been mentioned, but Mu type deserves further consideration. The designation Mu comes from the mutagenic capacity of this phage as consequence of its peculiar mode of replication by transposition. The DNA molecule found in the Mu nucleocapsid is ~39 kb long, but there is host DNA at both ends of this molecule. There are also a number of structural and regulatory proteins similar to those of λ . However, two peculiarities characterize Mu and related phages, namely, the presence of gene A, that encodes a transposase, and an invertible segment (G), responsible for host specificity. Both the lytic and lysogenic cycles involve the integration of Mu DNA into the host genome, and are dependent on the presence of a regulatory protein (a product of the *c* gene). In either case, the replication of Mu DNA involves repeated transposition of Mu to multiple sites in the host genome (32).

Genomic comparisons

The sequencing of various bacterial genomes has revealed the presence of prophages in most cases. Additionally, the genomic sequences of a number of phage virions have been determined (4,15,40,41,42,43). This information has improved our knowledge of phage biology and evolution. Phage genomes can be divided into modules, each one associated with specific biological functions, such as head and tail morphogenesis, DNA replication, and so on. Overall, these analyses have revealed that phage genomes have a similar gene organization, but are a genetic mosaic when compared to each other. This mosaic organization can result from the exchange of modules, or parts of them, through recombination processes (4,15,40,41). However, the genetic mechanisms driving these processes are still a matter of debate. There is evidence indicating the occurrence of illegitimate recombination events, as well as homologous recombination. Both of these processes probably account for the variety of the overall picture (15).

Further discussion of this subject can be facilitated by a consideration of tailed phages. A comparison of the genomes of two tailed phages from the same group but with distant hosts, or of phages from different groups that infect the same host, shows that there is little or no sequence similarity

between them, despite a possibly close relationship in gene maps. This situation is reinforced by the fact that even closely related bacterial strains of the same species almost never harbor completely identical prophages. For example, the recently sequenced strains of *E. coli* O157:H7 could be perfectly aligned at the DNA sequence level. However, most of the differences between these strains relied on prophages and, despite the very short evolutionary distance separating them, only one lambdoid prophage pair could be aligned over the entire length, without any modular exchange (44,45). Thus, identical phages may occur in the same bacterial strain, but this is a rare observation. The recently sequenced *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 strain (46) for instance, reportedly contained four prophages or prophage remnants (CvP1 to CvP4). None of the prophages were identical to each other, but all had a mosaic genome, implying that the phages were perhaps formed by module exchange from phages of related or distant groups (47).

In conclusion, phages have an amazing ability to exchange genetic material and generate new combinations of genes after co- or multi-infection of the same host. The genetic variability generated by this recombination process is considerable, although natural selection operates as a bottleneck to favor recombinants that are more adapted to the environment.

Phage ecology

Phage ecology involves the study of the interactions between phages and their biotic and abiotic environments (28,48). Assuming that the existence of viruses preceded the appearance of eukaryotes, ecological interactions involving phages are among the most ancient we know, and still exist today. In the following discussion, the terms bacteria and prokaryote refer to both *Eubacteria* and *Archaea*.

Prokaryotes have a remarkable genetic and phenotypic plasticity that allows them to overcome a wide range of evolutionary obstacles, given sufficient time. Hence, the survival of bacteriophages up to now indicates either that they possess an even greater plasticity than other organisms or that the advantages associated with their presence surpass the disadvantages. There is controversy regarding the first of these hypotheses, but increasing evidence to support the second. A better understanding of these benefits can be obtained by changing some paradigms about viruses.

Classically, viruses have been defined as obligatory intracellular parasites. An obligatory intracellular existence reflects their lack of endogenous metabolism and the need for external protein machinery for replication. However, their designation as a parasite is not entirely appropriate when all phage interactions are emphasized. The sheer number

of phages, as well as their diversity and that of their hosts, has resulted in the emergence of complex ecological relationships that we are only now beginning to understand. Hence, it would be an oversimplification to characterize all phage interactions as parasitism.

Given the abundance and specificity of bacteriophages, one could assume that neutralism would be the rule for these organisms. If one considers only direct relationships among these viruses and other species (cellular or acellular), then this assumption would be true, but still difficult to prove. However, if the indirect effects of these relationships are also emphasized, then neutralism may be considered rare, as discussed below (3).

Phages that share partial or entire host ranges compete directly among themselves for resources (3). Several mechanisms have confirmed this intra- and interspecies competition, including structural alterations of surface molecules and/or bacterial cell wall properties after an infection, and the production of repressor molecules by lysogenic phages that neutralize similar phages (3). Such competition can be extended to other organisms, such as predatory bacteria (*Bdellovibrio*, *Daptobacter* and *Vampirococcus*) and heterotrophic flagellates (grazers). Competition with grazer protists is especially important given the role that grazers and phages play in the biological control of bacteria. Generally, both are responsible for approximately 50% of bacterial mortality, with a preference for one or the other in certain environments. Such competition markedly influences the local food chain. Protist grazing removes nutrients from the microflora and makes them available for higher trophic levels. Phage lysis, on the other hand, releases the nutrients for the rest of the microbial community, thereby creating a semi-closed loop (viral loop) of cellular debris (30). This competition also determines a commensal relationship with other phages that do not compete actively for resources. The elimination of some bacteria increases the chances of other phages finding a host, and increases the probability of a successful infection (3).

The occurrence of mutualistic relationships can complicate these interactions and their interpretation. Among phages, this situation can arise after a co-infection followed by recombination of the genomes. Such recombination may occur between phage genomes (related or unrelated) or even between infecting phages and prophages inserted in the host chromosome (3). (The potential for genetic recombination between phages has been discussed above).

Several interactions between phages and bacteria can be considered to be mutualistic. Bacteriophages are considered mobile genetic elements that act as vectors for lateral gene transfer (LGT) through transformation and especially transduction (generalized or specialized) (30). Theoretically,

phages favor transformation, i.e. the uptake of dissolved DNA from the environment, following the release of nutrients after cell lysis. Although most bacterial DNA serves as a substrate for phage DNA synthesis, some of the host DNA contributes to the environmental pool of dissolved DNA and becomes available to the remaining bacteria capable of importing these molecules. Transduction, which until recently was attributed a secondary role in LGT, has been reevaluated after recent estimates of the abundance of viruses in the environment. Transduction consists in the transfer of genetic material from a donor bacterium to a recipient bacterium through a proteinaceous viral capsid. This event provides a safe way of ensuring the transport of genetic material (via the viral capsid) since it does not rely on the coexistence, temporal or spatial, of donor and recipient bacteria. The importance of transduction has also been reassessed in view of the abundance of bacteriophages in the environment and the multiplicity of niches occupied by phages. With generation rates of a day, transduction allows the occurrence of rare genetic events (10^{-20}) millions of times per day (30,48).

Transduction can be specialized or general. Specialized transduction occurs when a lysogenic phage excises genes from the cell during induction and carries these host genes in its own genome during subsequent infections. The expression of these genes in the new host occurs during lysogeny or in specific stages of infection. This process defines the *lysogenic conversion* (or *phage conversion*) of the bacteria, and may possibly confer a new characteristic to the recipient host that can lead to a selective advantage in a given niche. Such a selective advantage may result in larger bacterial progeny containing the viral genome, thereby benefiting both species. In certain pathogenic bacteria, these characteristics include virulence factors (40,48,49). Transduction, which occurs in pathogenic as well as commensal and free-living bacteria, is capable of conferring new metabolic, pathogenic or adaptive characteristics that can influence the survival of the bacterial population (30,40,48,50).

Generalized transduction occurs when the genetic material from the donor is mistakenly incorporated into the capsid of a lytic phage and transferred to the recipient during an infection. This relationship benefits only the bacteria through LGT and is prejudicial to the phage by reducing its progeny. There are also examples where bacteria improve this advantage further by using a defective prophage to improve the probability of recombination through LGT. In the case of *Bacillus subtilis*, the bacterium uses the capsid of a defective prophage (PBSX) to pack random 13 kb fragments of its own DNA. Other organisms, from the three domains of life, use prophage remnants as gene transfer agents (GTAs). In GTAs, transduction is constitutive, non-lethal, and more efficient. The bacterium

Rhodobacter capsulatus, for example, promotes the transfer of 4.5 kb fragments in the stationary phase. Another example involves the pathogenicity island SaPII (15 kb) of *Staphylococcus aureus* in which infection by phage 80 α is used for auto-replication and for packing SaPII DNA instead of the viral genome (40).

Bacteriophages can contribute to the generation of anchorage points for chromosomal breaks and rearrangements through lysogenic insertion into the host bacteria. Together with other mobile genetic elements, phages offer repetitive sequences to bacterial genomes, thereby facilitating internal recombinations. The mechanism involves protein RecA (part of the recABC system discussed above), the function of which is to repair chromosomal breaks using a duplicated copy of the damaged sequence as a model. However, in the presence of multiple copies from a given DNA sequence, RecA promotes recombination between paralogs that can involve sequences with the same (direct repeats) or inverted (inverse repeats) orientations. The former results in duplications, deletions or translocations while the latter produces inversions. These alterations amplify and reposition genes, but are usually unstable and are maintained only through constant selective pressure or subsequent mutations that hinder new rearrangements. Another possible contribution of LGT to genomic rearrangements is through the insertion of new DNA, which can upset the stability of the genome and trigger compensating rearrangements (51). These breaks and rearrangements may also benefit phages inserted in the genome by providing a new evolutionary alternative. For example, in the M3 lineage of *Streptococcus pyogenes*, a rearrangement anchored in prophages shuffled the genomes and resulted in two new prophages that, once excised, produced different offsprings from those that initially infected the bacteria, thereby widening the gene pool of the local viral population (49).

LGT and chromosomal rearrangements are important mechanisms for maintaining bacterial plasticity and the rapid evolution of bacteria. This rapid evolution is particularly important in medical practice because of constant pressure from the immune system and from chemotherapy (50,51). Theoretical predictions indicate that most of these alterations will not be fixed, but will be eliminated through insertions (short-term) and deletions (long-term) (50). Nevertheless, the acquisition of new traits by bacteria through LGT has received considerable attention recently, particularly with respect to traits associated with bacterial pathogenesis (9,15,40). Many of these LGT events are mediated by phages. The first examples were the neurotoxin of *Clostridium botulinum* and the toxin of *Corynebacterium diphtheriae*. Only lysogenic strains of these bacteria contain the toxin genes that are located in prophage genomes (52). A recent designation for these

genes that apparently have no function in phage physiology but improve host fitness is *moron*, for “more DNA” (15). Other examples of morons involving different bacteria and phages are also known (revised by 15).

The major virulence factors of *Vibrio cholerae* are cholerae toxin (CT) and the TCP fimbriae (53). Both factors have been associated with phage genes but the phage origin for TCP has recently been debated (10). CT is a CTX Φ -encoded virulence factor. CTX Φ , a filamentous phage with ssDNA, binds to *V. cholerae* through TCP and injects its nucleic acid into the cell. The CTX Φ DNA, which carries other virulence genes in addition to CT, is inserted into the bacterial chromosome (Figure 6). Thus, a major virulence determinant of *V. cholerae* is phage-derived. A variety of phages is also responsible for the origin of epidemic strains of *Salmonella enterica* and may explain the different degrees of virulence shown by *S. pyogenes* strains (40,41). Phages are also involved in the origin and transmission of pathogenic islands (PI) in many pathogenic bacteria (54). Overall, phages have emerged as important mediators in the adaptation of pathogens to new hosts and in the appearance of new pathogens and epidemic clones. This has led to a conceptual change from the classic host-pathogen interaction to a novel host-pathogen-phage interaction (15).

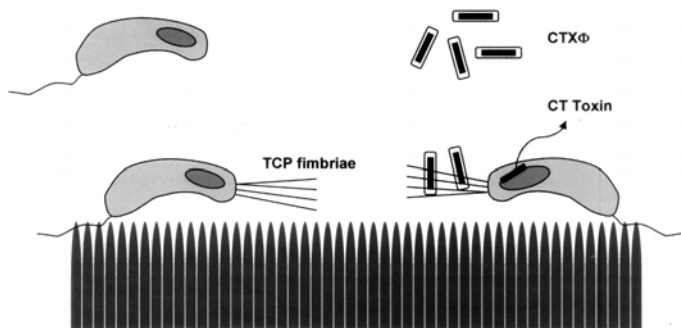


Figure 6. Transmission of CT toxin genes through transduction by the CTX Φ filamentous phage. See details in the text.

Parasitism, although not the only ecological relationship of viruses, also has a role in phage ecology. Parasitism may occur between phages when a defective phage uses the capsid of another phage to encapsidate its own genetic material. In such cases, the first phage is denominated the *satellite* while the second is referred to as the *helper*. The first phage benefits itself at the expense of the progeny of the second (3). Parasitism can also occur in the classic manner via a virus-prokaryote interaction.

Lysogenic phages that transduce unnecessary genes or none at all would benefit from such an interaction by not having to search for new hosts and by having available resources to start a lytic cycle and produce offspring. Nevertheless, viruses represent an extra burden for a bacterium, which has to replicate phage genomes in addition to its own and is under constant threat of lysis from phage induction.

However, the application of a parasitic role to all phages has been challenged and may not be appropriate since bacteriophages with strict lytic cycles may show the population dynamics of predators and, in many cases, do not interfere with host metabolism until the final stages of infection; such behavior is typical of predators (3). One particularly interesting example of this dynamic is the role played by phages in the seasonality of cholera epidemics. The self-limiting nature of this seasonality was recently attributed to the amplification of *V. cholerae* lytic phages in both the environment and the host, thus collapsing the epidemics (55). This concept review modified the perception of the role of phages in food chains, an aspect neglected until recently. In certain environments, phage predation is indeed higher than protist grazing and represents one of the main biological mechanisms for maintaining the bacterial population below the resource limit level, thereby ensuring survival of the bacteria in such places (30).

Phage predation still favors local communities in two other ways. One of the first models proposed, termed “killing the winner”, suggested that bacteriophages influenced the local diversity by eliminating more competitive species because these, through clonal expansion, would reach higher numbers and have an increased chance of random encounters with phages. Through this elimination, less competitive species would continue to exist, and would benefit local biodiversity by maintaining a varied gene pool (3). Another benefit, already mentioned, involves the release of nutrients. When a bacterium is lysed by bacteriophages, several dissolved organic molecules (monomers, oligomers and polymers), colloids and cellular debris are released to the medium; this material is referred to as dissolved organic matter (DOM) (30). Bacterial lysis and the release of cell contents into the environment have potential biogeochemical effects because of the physical and chemical properties of these compounds and their location in the local microenvironment. Almost all of the studies on this subject have dealt with aquatic environments in which released polymers contribute to local gel properties. These properties influence several biological and microscopical physicochemical processes and may facilitate the aggregation and sinking of material, and therefore its removal from the local microenvironment. On the other hand, the infection and lysis of microorganisms that are part of these sinking aggregates dissolve these

aggregates, releasing particulate material into the non-sinking DOM, thus making them available, modifying locally the environmental characteristics. These are examples of how phages may influence the composition of the environment that they occupy (30).

Environmental factors such as water (or lack of it), temperature, hydrostatic pressure, radiation, physical forces, ionic environment, oxygen level, the presence of organic matter and host availability can also influence the survival and propagation of phages (3). The presence of water allows viral diffusion whereas a lack of water implies a need for protection against desiccation. Temperature may directly affect the survival of phages and influence their infectivity. Environmental radiation is an important mechanism of viral destruction, mainly through UV light. Certain wavelengths are notorious for their ability to damage DNA, while others induce bacterial repair systems that correct the damage done, including damage to the genome of the infecting virus (30). Physical forces such as waves, currents and winds influence the environmental distribution of viruses. Phages are also transported by adsorption to mobile organisms or particulate material. Atmospheric transmission is an alternative for soil dwelling or superficial water phages and transmission through ballast water has recently been recognized as a mechanism of the propagation for several microorganisms (56). Chemical conditions also influence phages directly by affecting their stability and infectivity (ionic environment, pH), or indirectly, through interference in the metabolic/nutritional status of the hosts (availability of C, N, P, S, Fe) (3). Since foreign metabolism is necessary for viral replication, the physiological status of the prokaryotic host is an extremely important factor for viral survival. The production of new phages depends intrinsically on the host cell's contents, nutrient uptake system, general metabolism and molecular machinery (48). Phage production has been observed in starved cells (up to five years) and even in recently killed cells, although in both cases cell lysis was delayed and the burst size reduced (57). These observations are a reminder that our knowledge of the metabolic status of prokaryotic cells *in situ* and their general welfare is still limited, and that a thorough knowledge of phage-host systems is essential for ecological studies and for the development of safe, effective therapies based on bacteriophages (58).

Phages as biological tools

General considerations

The relative simplicity of bacteriophages makes them useful tools in a number of fields of biological study. Indeed, several of the basic questions in Microbiology and Molecular Biology were resolved by historic

experiments in which phages were used as biological models. The first studies on virus-host relationships, which provided much information about the biological cycle of viruses, involved phages and their bacterial hosts. The initial characterization of gene structure and regulatory mechanisms was based on concepts derived from phage studies. The gene overlapping phenomenon was first described in phages. Important steps in genetic engineering also paralleled phage science. The discovery of restriction enzymes was made during research on phages and new vectors for gene cloning and expression were developed by using phage nucleic acids as a biological tool. It is important to remember that the first DNA molecule to be sequenced was a phage genome. In this topic we briefly discuss this aspect of phage biology with an emphasis on phage therapy, an early field of research that has reemerged as a new hope in the fight against multi-resistant bacteria, to be deployed alongside conventional antibiotic therapy.

Phages in molecular biology

The early classic studies on inheritance in bacteria were conducted using phages as biological tools. For instance, one of the first convincing demonstrations that bacterial inheritance follows Darwinian principles was made in 1943 by Salvador Luria and Max Delbrück (6). These authors showed that in bacteria, resistance to phages occurs randomly in a growing population, even in the absence of the phage. In 1952, Norton Zinder and Joshua Lederberg described the third event of recombination in bacteria. Working with *Salmonella typhimurium*, they demonstrated that a phage (P22) could transfer DNA between different strains in a process denominated transduction (59) (this topic has been covered in prior sections).

In 1955, the experiments of Seymour Benzer on phage genetics demonstrated that recombination could also occur within genes and not only between genes as had been believed. He showed that recombination is possible within *rII* genes of phage T4 (in 6).

An important step for gene cloning was attained in 1973 when Cohen and collaborators (60) employed restriction endonucleases (discovered in the 1960s) to clone heterologous genes in *E. coli*. From that starting point, a number of vectors were constructed for gene cloning and expression. Phage λ DNA has a central role in this respect. Many different vectors used to construct genome libraries (both prokaryote and eukaryote) are based on phage λ . Cosmids are plasmids that contain *cos* sites and after the cloning of DNA sequences, these vectors can be encapsidated as the λ DNA. Because cosmids may carry long DNA sequences (about 40kb) they are used for genome library construction. For instance, many bacterial genome projects used these vectors. In a frequently-used strategy, a shotgun library is first

sequenced to saturation. The gaps of unknown sequences remaining in the bacterial genome are then closed by sequencing cosmids from the library, selected to contain DNA segments covering those gaps. This strategy was recently used in association with others for the *Chromobacterium violaceum* complete genome sequence (46).

Filamentous phages such as M13 have been used for DNA sequencing experiments. This strategy explores the capacity of this phage to generate ssDNA molecules during replication. The M13 phage is also used to generate phage virions that express proteins of heterologous origin fused to capsid constituents. This technique, called *phage display*, makes use of phagemids, a type of vector that replicates in bacterial cells and can also be encapsidated by co-infecting the host cell with “helper” phages (as discussed previously). This technique has been extensively used to construct antibody libraries, by-passing the hybridoma technology (reviewed by 61). In a recent application of this approach, recombinant M13 phages displaying variable fragments of monoclonal antibodies, directed against *Helicobacter pylori* surface antigens, were constructed and shown to inhibit the colonization of the stomach by this bacterium in the mouse model of infection (62).

Phage therapy

One of the prospects of a thorough understanding of bacteriophages is the possibility of using them to control their prokaryotic hosts. As natural bacterial predators, lytic phages are potential candidates for this type of control. Against phytopathogens, this approach is referred to as biocontrol (58), whereas against human and animal pathogens, the most widely used term is phage therapy (19,63,64,65).

This idea is not particularly new or innovative. Soon after discovering (or rediscovering) phages in 1917, Felix H. D’Herelle tested this possibility experimentally (1,19,63). D’Herelle was acquainted with ecological approaches for pest control and studied the population control of locust plagues in Central and South America and North Africa by using entomopathogenic bacteria (19,64). When he discovered viruses that lysed bacteria, he conceived the theory of “exogenous agents of immunity” (19) and pursued their therapeutic use against bacterial pathogens that posed alarming threats in the pre-antibiotic era. His first experiments focused on animals, with attempts to fight avian typhosis (*Salmonella enterica* Gallinarum) in field trials and rabbit infections by *Shigella dysenteriae* in laboratory conditions. The first experiments provided satisfactory results by the standards of the time (and were encouraging even by present criteria). Field tests against bovine haemorrhagic septicemia followed these studies, and also provided satisfactory results. With this success against

gastrointestinal disease (avian typhosis) and bovine haemorrhagic septicemia, D'Herelle expanded his studies to humans. After completing the simple toxicity tests required at the time, he started to develop therapies against various diseases, including bubonic plague in Egypt, cholera in India, skin infections (both acute traumas and surgical wounds), refractory skin ulcers and perforating osteomyelitis. Various other studies were reported in the literature of that period (64). However, several failures resulted from a poor understanding of phage and bacterial biology, a lack of standardization of the phage preparations and a lack of criteria regarding the potency and purity of the preparations (63,65). By this time, antibiotics had been discovered and their use spread quickly. The relatively wide spectrum of antibiotic action, together with the ease of production and their stability eclipsed phage therapy in the Western World (19,58,63,64). Heavy investments by the pharmaceutical industry made antibiotics the basis for treating bacterial infections. In Eastern Europe and the Soviet Union, however, the therapeutic uses of phages progressed and there are several studies on this subject in non-English publications (Georgian, Russian and Polish) that serve as a basis for modern studies (19,64).

In the West, phages continued to be studied, but with different aims. Their relative simplicity proved indispensable for examining host-parasite relationships, viral multiplication mechanisms and the elucidation of several other biological, genetic and molecular aspects (28,48,58,66). Their therapeutical use, however, was abandoned in favor of antibiotics. The latter raised hopes that it would be possible to control all bacterial infections in a matter of time. Bacteria, meanwhile, proved more versatile than expected, and there are now countless multidrug-resistant bacterial strains, including to the most recent antibiotics. Given sufficient time, this phenomenon of drug resistance can be especially dangerous in medical practice (58,64,66,67). For this reason, efforts have been directed towards the discovery of alternatives for dealing with resistant microorganisms, and therapeutic approaches involving bacteriophages have once again become an interesting possibility worthy of reevaluation using modern procedures.

Several aspects inherent to this treatment have been extensively discussed and studied. One of these aspects is the distribution of phages in the organism infected by bacteria. The discussion has centered on the size and complexity of phages compared to the small molecules of antibiotics, with the argument being that these properties would make it difficult for the phage to reach remote or deep sites of infection, especially in abscesses and bacterial biofilms (68). In addition, there could be problems resulting from immunological reactions. However, antibiotics may also have a restricted distribution in certain organs and tissues, and their efficacy may be reduced at these sites because of their metabolism and excretion (69).

The replication of phages when in contact with their hosts may represent an advantage in this regard (64,66,69,70).

Contrary to previous theories, phages are able to penetrate biofilms and some phages can produce enzymes (polysaccharases and polysaccharide lyases) that allow the species-specific dissolution of the exopolysaccharide matrix that sustains the biofilm structure. The infection can be treated even without these enzymes since the biofilm architecture contains water pores and channels large enough to accommodate phages. Certain biofilms can concentrate viruses over 100-fold and can serve as a reservoir for phages, releasing them as part of the biofilm sloughing during ageing. The situation is more complicated in biofilms of polymicrobial composition, especially when they involve bacterial co-aggregation that can occlude phage receptors. Moreover, bacteriophages alone are unable to completely eradicate various biofilms, although they have been shown to act synergistically with antibiotics in at least one case. Biofilm structures vary considerably and our knowledge of this subject is still elementary so that no definitive conclusions can yet be made (71).

As to the penetration of phages in vertebrates, recent reviews on the subject offer new perspectives. Experimental data confirm that bacteriophages penetrate blood and tissues quite freely and from different routes of administration. They can traffic through almost all tissues (even reaching the central nervous system) and they retain their multiplication potential in sites of bacterial infection (72). In fact, their ubiquity associated with this penetration potential ensures that phages are transient passengers in complex organisms, sometimes resulting in changes in vertebrates through this interaction. There is data available suggesting the potential for endogenous bacteriophages to eliminate invading bacteria and regulating the body ecosystem thus suggesting that phage therapy may be occurring constantly in nature (73). Some data also suggests action in concert with the commensal flora and the immune system in immunosurveillance against bacteria, viruses and cancer (73). And it is also of special emphasis that, in spite of this alleged continual interaction, there is no report of infection of or harm to eukaryotic cells caused directly by bacteriophages.

Bacteriophages do not readily elicit an immune response, and by the time a specific response is elaborated, the therapy had already been completed. The immune response against phages is part of the normal body response to bacterial infections and the accompanying phage replication, and although the possibility of viral neutralization exists, experimental data suggest the immunogenicity of phages is weak in most patients. In addition to a direct lytic effect, treatment with bacteriophages can indirectly enhance the resolution of an infection by upregulating depressed immunity *in vivo*

and *in vitro* (74). Some studies have shown that an important mechanism for eliminating bacteriophages is their filtration by the Mononuclear Phagocyte System (MPS) (65). However, the development of phage variants capable of greater evasion of the RES during serial passages in mice has yielded phages with a longer half-life and improved therapeutic efficacy (63). The ability of phages to reach intracellular targets has also been questioned, although there are some answers to this objection. One of these comprehends the utilization of avirulent strains of the same bacterial genus as penetration vector of bacteriophages into the intracellular environment. As shown for *Mycobacterium avian* and *Mycobacterium smegmatis*, this is a valid approach with promising results for the future (75).

The ease with which bacteria can become resistant to phages also requires consideration. As demonstrated by the classic Luria-Delbruck fluctuation test, which showed that mutations are spontaneous and not induced, bacteria naturally develop resistance to phages with an approximate frequency of 10^{-6} (in 68). Several mechanisms can provide antiphage defenses, including adsorption inhibition (caused by lack of receptor expression, structural alterations or masking of the receptors), the inhibition of DNA injection (through alteration in membrane fluidity or enzyme resistance), restriction-modification systems (composed by endonucleases that digest non-modified foreign DNA; these systems may be countered by phages) and abortive infections (interference with phage DNA after injection into the cell; includes suicidal sacrifice to preserve the population) (3). However, the conditions of laboratory experiments do not mimic the situation *in vivo*, in which intricate interactions with a complex immune system contribute to the elimination of the pathogens. The efficacy of phage therapy, despite bacterial resistance, has been confirmed by experiments in which the timely administration of phages was effective in rescuing infected animals, in some cases after only a single dose (65,69,70). Specific mention should be made here of studies of host-parasite relationships. When the aspects of these interactions become clearer, it will be possible to develop approaches with a higher probability of success. In a particularly interesting study by Smith (76), the phage that was used therapeutically had a receptor that was one of the main virulence factors of the host bacterium, the K1 antigen of *E. coli*. In this case, the treatment was successful since the acquisition of phage resistance by receptor concealment (adsorption inhibition) reduced the bacterial virulence by facilitating elimination of the pathogen by the immune system.

The potential of certain phages to mediate gene transduction is a question that goes back to the initial flaws in phage therapy (68). A lack of attention to this factor can indeed aggravate an existing infection through

the spread of harmful genes throughout the organism. With our current knowledge of phage biology, it is possible to search phage genomes for the presence of these genes or the potential for transduction and then alter or eliminate them to avoid problems (69). Controlled laboratory studies will complement our knowledge about the innocuity of phages produced this way.

Phages have an impressive lytic capability, and the elimination of a large number of bacteria in a short time leads to the release of toxic bacterial products that can result in septic shock or other adverse reactions (68). Such potentially adverse effects have not been seen in laboratory and field trials, suggesting that even in well-established infections where large numbers of target bacteria are present, only moderate numbers of bacteria are lysed at any given time (70). However, there is still the possibility that genetic alteration to phages can avoid this step, with the bacterium being killed without lysing the cell, thereby drastically reducing the release of toxic compounds (67).

Bacteriophages commonly infect a limited number of bacterial species, and sometimes only some strains within a species (28,64,68,74). This specificity of phages can be both beneficial and prejudicial. The beneficial aspect is their relative innocuity to the natural microbial flora of the organism, which contrasts with the indiscriminate action of antibiotics (64,66). The prejudicial aspect involves the need to confirm the target cell permissiveness to treatment. Such practice, ideally necessary for antibiotic therapy too, increases the costs of this therapeutic alternative and requires extra time (68). Nevertheless, the test of bacterial susceptibility to phages is simpler and quicker than that for antibiotic sensitivity. It is also possible to use phages with a wider host range, or to use cocktails containing two or three phages specific against the main bacterial pathogens determined by epidemiological studies (69). Although standard cultivation techniques favor specific phages, there are reports indicating that this specificity is derived from receptor availability (in 29). The recent discovery of bacteriophages (*Bordetella* phages) with a notable capacity for the intrinsic generation of receptor diversity is an interesting example of the importance of receptors. This process involves a reverse transcriptase-mediated nucleotide substitution that results in amino acid substitutions at specific positions in the protein responsible for host recognition (77).

Clearly, there is a need for additional investigation on the therapeutic uses of phages (63,65,66,67,74,78). Recent studies have provided promising results, as in the case of phage therapy using phage ENB6 from *Enterococcus*, which recently progressed to phase II tests (79). Several obstacles to phage therapy have been overcome by simple, but original ideas supported by elaborate experiments. An important consideration is

that phage therapy is being proposed as an alternative or complement to, rather than a substitute for, antibiotic therapy (66,69,74). Such an alternative provides a potential means for dealing with multidrug-resistant bacteria, especially in life-threatening infections for which no other therapies are currently available. Only after appropriate studies of phage-antibiotic interactions it will be possible to determine the usefulness of a given therapeutic approach, as well as synergisms or antagonisms resulting from this interaction (69).

Phages can also contribute to the treatment of bacterial infections in two indirect ways. The first consists in the use of bacteriophage products, such as purified lytic enzymes (holines, lysines and polysaccharases). The rapid, efficient action of these enzymes in eliminating bacterial suspensions has been demonstrated, such as for *Bacillus anthracis* (78). Another indirect approach involves the screening of phage genomes for proteins that arrest critical host cell processes by interfering with host metabolism. The viability of this approach was recently demonstrated by the development of a high-throughput screening procedure to identify small molecules that inhibit bacterial growth through mechanisms similar to those of phage proteins (80).

There is some data also suggesting the potential of phage therapy for viral infections and cancer. Phages can elicit protection against eukaryotic viruses through several mechanisms, including induction of the immune system through the presence of phage nucleic acids, competition for cellular receptors and expression of antigens through phage display, to mention some (81). Interactions of phages and human cancers are also described, even leading to tumor growth inhibition (72).

Overall, the various aspects discussed above provide a stimulus for further studies of bacteriophages, including their direct use in medical practice, and has resulted in the so-called “renaissance” of phage therapy.

Concluding remarks

Bacteriophages are one of the most (if not the most) diverse and abundant biological entities in the world. The description of this diversity is only just beginning. The majority of bacterial viruses are tailed phages exhibiting a complex morphology. Phages have an important role in nature, participating in biogeochemical cycles and controlling bacterial populations. Phage-bacteria relationships are complex and, in our present state of knowledge, it is possible to conclude that in order to understand the biology and evolution of prokaryotes it is necessary to know the biology of phages. The genome of a bacterium is shaped by phages. The acquisition of new functions, mediated by lateral gene transfer (LGT), is the main process that governs rapid bacterial evolution, enabling the adaptation of the

bacteria to new environments in a “quantum leap” manner. The phage genomes are modular, as a result of recombination on the one hand and selective pressures on the other. The development of new techniques for phage characterization have opened an avenue for research that must be explored. The Microbiology and Molecular Biology disciplines have been making use of phages as biological models and/or biological tools for some time. Nowadays, one of the hopes of the health sciences is so-called phage therapy, as in the use of phages to fight pathogenic, especially multidrug-resistant, bacteria and maybe even cancer or eukaryotic viruses. In essence, life on earth would not be the same without phages.

Acknowledgments

The research projects in MB and WDS Laboratories are supported by grants from Brazilian National Council of Research (CNPq) and Research Support Foundation of the São Paulo State (FAPESP). GBG is supported by a fellowship from CAPES.

References

1. Ackermann, H.W. 2003, *Res. Microbiol.* 154(4), 245.
2. Ackermann, H.W. 2001, *Arch. Virol.*, 146(5), 843.
3. Weinbauer, M.G. 2004, *FEMS Microbiol. Rev.*, 28(2), 127.
4. Brussow, H., and Hendrix, R.W. 2002, *Cell.*, 108 (1), 13.
5. Rohwer, F., and Edwards, R. 2002, *J. Bacteriol.*, 184 (16), 4529.
6. Campbell, A. M. 2001, *Fields-Virology*, D.M. Knipe & P.M. Howley (Eds), Lippincott Williams & Wilkins, USA, 659.
7. Nakayama, K., Takashima, K., Ishihara, H., Shinomiya, T., Kageyama, M., Kanaya, S., Ohnishi, M., Murata, T., Mori, H., and Hayashi, T. 2000, *Mol Microbiol.*, 38(2), 213.
8. Boyd, E.F., and Brussow, H. 2002, *Trends Microbiol.*, 10(11), 521.
9. Wagner, P.L., and Waldor, M.K. 2002, *Infect. Immun.*, 70(8), 3985.
10. Davis, B.M., and Waldor, M.K. 2003, *Curr. Opin. Microbiol.* 6 (1), 35.
11. Ackermann, H.W. 2000, *Encyclopedia of Microbiology*, Vol. I, J.S. Lederberg (Ed.), Academic Press, Burlington, MA 01803, USA
12. Stopar, D., Spruijt, R.B., Wolfs, C.J., and Hemminga, M.A. 2003, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1611(1-2), 5.
13. Proctor, L.M., and Fuhrman, J.A. 1990, *Nature*, 343, 60.
14. Suttle, C.A., Chan, A.M., and Cottrell, M.T. 1990, *Nature*, 347, 467.
15. Brussow, H., Canchaya, C., and Hardt, W.D. 2004, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68(3), 560.
16. Handelsman, J. 2004, *Microbiol Mol Biol Rev.* 68(4), 669.
17. Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.L., Rusch, D., Eisen, J.A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K.E., Nelson, W., Fouts, D.E., Levy, S., Knap, A.H., Lomas, M.W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J.,

- Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y.H., and Smith, H.O. 2004, *Science*, 304(5667), 66.
18. Breitbart, M., Hewson, I., Felts, B., Mahaffy, J.M., Nulton, J. Salamon, P., and Rohwer, F. 2003, *J. Bacteriol.*, 185(20), 6220.
 19. Summers, W.C. 2001, *Annu. Rev. Microbiol.*, 55, 437.
 20. Lwoff, A., Horne RW, and Tournier, P. 1962, A system of viruses, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 27, 51.
 21. Brooks, G.F., Butel, J.S., and Morse, S.A. 2001, Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology, Ed. Lange Medical Books, McGraw-Hill, NY, USA.
 22. Wildy, P. 1971, Monographs in Virology 5, Basel, S. Karger.
 23. Mindich, L., Qiao, X., Qiao, J., Onodera, S., Romantschuk M., and Hoogstraten D. 1999, *J. Bacteriol.*, 181 (15), 4505.
 24. Prangishvili, D., Stedman, K., and Zillig, W. 2001, *Trends. Microbiol.*, 9 (1), 39.
 25. Hurst, C. 2000, *Viral Ecology*, C. Hurst (Ed.), Academic Press, San Diego, USA, 41.
 26. Villarreal, L.P., and DeFilippis, V.R. 2000, *J. Virol.* 74 (15), 7079.
 27. Lwoff, A. 1953, *Bacteriol Rev.*, 17(4), 269.
 28. Gill, J., and Abbedon, S.T. 2003, APSnet (<http://www.apsnet.org/online/feature/phages/>). Last access in 05/05/2005.
 29. Lindberg, A.A. 1973, *Annu. Rev. Microbiol.*, 27, 205.
 30. Fuhrman, J.A. 1999, *Nature*, 399(6736), 541.
 31. Young, I., Wang, I., and Roof, W.D. 2000, *Trends Microbiol.*, 8(3), 120.
 32. Madigan, M.T., Martinko, J.M., and Parker, J. 2000, *Brock's Biology of Microorganisms*, Prince Hall, Upper Saddle River, NJ, USA.
 33. Raoult, D., Audic, S., Robert, C., Abergel, C., Renesto, P., Ogata, H., La Scola, B., Suzan, M., and Claverie, J.M. 2004, *Science*, 306 (5700), 1344.
 34. Young, R. 1992, *Microbiol. Rev.*, 56(3), 430.
 35. Sanger, F., Air, G.M., Barrell, B.G., Brown, N.L., Coulson, A.R., Fiddes, C.A., Hutchison, C.A., Slocombe, P.M., and Smith, M. 2004, *Nature*, 265(5596), 687.
 36. Ishihama, A. 2000, *Annu. Rev. Microbiol.*, 54, 499.
 37. Kruger, D.H., and Schroeder, C. 1981, *Microbiol. Rev.* 45(1), 9.
 38. Miller, E.S., Kutter, E. Mosig, G., Arisaka, F., Kunisawa, T., and Ruger, W. 2003, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67(1), 86.
 39. Lewin, B. 2000, *Genes VII*, Oxford University Press, Great Clarendon Street, Oxford, UK.
 40. Canchaya, C., Fournous, G., Chibani-Chennoufi, S., Dillmann, M.L., and Brussow, H. 2003, *Curr. Opin. Microbiol.*, 6(4), 417.
 41. Canchaya, C., Proux, C., Fournous, G., Bruttin, A., and Brussow, H. 2003, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67(2), 238.
 42. Casjens, S. 2003. *Mol. Microbiol.*, 49(2), 277.
 43. McGrath S., Fitzgerald G.F., and van Sinderen D. 2004, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 15 (2), 94.
 44. Ohnishi, M., Kurokawa, K., and Hayashi, T. 2001, *Trends. Microbiol.*, 9 (10), 481.
 45. Perna, N.T., Mayhew, G.F., Posfai, G., Elliott, S., Donnenberg, M.S., Kaper, J.B., and Blattner, F.R. 1998, *Infect Immun.*, 66(8), 3810.

46. Vasconcelos, A.T.R., Almeida, D.F., Almeida, F.C., Almeida, L.G.P., Almeida, R., Alves-Gomes, J.A., Andrade, E.M., Antônio, R.V., Araripe, J., Araújo, M.F.F., Astolfi-Filho, S., Azevedo, V., Baptista, A.J., Bataus, L.A.M., Batista, J.S., Beló, A., van den Berg, C., Blamey, J., Bogo, M., Bonatto, S., Bordignon, J., Brito, C.A., Brocchi, M., Burity, H.A., Camargo, A.A., Cardoso, D.D.P., Carneiro, N.P., Carraro, D.M., Carvalho, C.M.B., Cascardo, J.C.M., Cavada, B.S., Chueire, L.M.O., Creczynski-Pasa, T.B., Duran, N., Fagundes, N., Falcão, C.L., Fantinatti, F., Farias, I.P., Felipe, M.S.S., Ferrari, L.P., Ferro, J.A., Ferro, M.I.T., Franco, G.R., Freitas, N.S.A., Furlan, L.R., Gazzinelli, R.T., Gomes, E.A., Gonçalves, P.R., Grangeiro, T.B., Grattapaglia, D., Grisard, E.C., Guimarães, C.T., Hanna, E.S., Hungria, M., Jardim, S.N., Laurino, J., Leoi, L.C.T., Lima, L.F.A., Loureiro, M.F., Lyra, M.C.C.P., Macedo, M., Madeira, H.M.F., Manfio, G.P., Maranhão, A.Q., Martins, W.S., di Mauro, S.M.Z., Medeiros, S.R.B., Meissner, R.V., Moreira, M.A.M., Nascimento, F.F., Nicolas, M.F., Oliveira, J.G., Oliveira, S.C., Paixão, R.F.C., Parente, J.A., Pedrosa, F.O., Pena, S.D.J., Pereira, J.O., Pereira, M., Pinto, L.S.R.C., Pinto, L.S., Porto, J.I.R., Potrich, D.P., Ramalho-Neto, C.E., Reis, A.M.M., Rigo, L.U., Rondinelli, E., Santos, E.B.P., Santos, F.R., Schneider, M.P.C., Seunanez, H.N., Silva, A.M.R., Silva, A.L.C., Silva, D.W., Silva, R., Simões, I.D.C., Simon, D., Soares, C.M.A., Soares, R.B.A., Souza, E.M., Souza, K.R.L., Souza, R.C., Steffens, M.B.R., Steindel, M., Teixeira, S.R., Urmenyi, T., Vettore, A., Wassem, R., Zaha, A., and Simpson, A.J.G. 2003, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100 (20), 11660.
47. de Almeida, R., Trevilato, P.B., Bartoletti, L.A., Proenca-Modena, J.L., Hanna, E.S., Gregoracci, G.B., and Brocchi, M. 2004, *Genet. Mol. Res.*, 3(1), 76.
48. Chibani-Chennoufi, S., Bruttin, A., Dillmann, M.L., and Brussow, H. 2004, *J. Bacteriol.*, 186(12), 3677.
49. Nakagawa, I., Kurokawa, K., Yamashita, A., Nakata, M., Tomiyasu, Y., Okahashi, N., Kawabata, S., Yamazaki, K., Shiba, T., Yasunaga, T., Hayashi, H., Hattori, M., and Hamada, S. 2003, *Genome Res.*, 13(6A), 1042.
50. Canchaya, C., Fournous, G., and Brussow, H. 2004, *Mol. Microbiol.*, 53(1), 9.
51. Hughes, D. 2000, *Genome Biol.*, 1(6), 6.
52. Freeman, V.J. 1951, *J. Bacteriol.*, 61 (6), 675.
53. Herrington, D.A., Hall, R.H., Losonsky, G., Mekalanos, J.J., Taylor, R.K., and Levine, M.M. 1988, *J. Exp. Med.*, 168 (4), 1487.
54. Hacker, J., and Kaper, J.B. 2000, *Annu. Rev. Microbiol.*, 54, 641.
55. Faruque, S.M., Islam, M.J., Ahmad, Q.S., Faruque, A.S.G., Sack, D.A., Nair, G.B., and Mekalanos, J.J. 2005, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102 (17), 6119.
56. Ruiz, G.M., Rawlings, T.K., Dobbs, F.C., Drake, L.A., Mullady, T., Huq, A., and Colwell, R.R. 2000, *Nature*, 408(6808), 49.
57. Schrader, H.S., Schrader, J.O., Walker, J.J., Wolf, T.A., Nickerson, K.W., and Kokjohn, T.A. 1997, *Can. J. Microbiol.*, 43(12), 1157.
58. Goodridge, L.D. 2004, *Trends Biotechnol.*, 22(8), 384.
59. Zinder, N.D., and Lederberg, J. 1952, *J. Bacteriol.*, 64(5), 679.
60. Cohen, S.N., Chang, A.C., Boyer, H.W., and Helling, R.B. 1973. *Proc Natl Acad Sci USA*, 70(11), 3240.
61. Pini, A., and Bracci, L. 2000, *Curr. Protein. Pept. Sci.*, 1(2), 155.

62. Cao, J., Sun, Y., Berglinde, T., Mellgard, B., Li, Z., Mardh, B., and Mardh, S. 2000, *Biochim Biophys Acta*, 1474(1), 107.
63. Merrill, C.R., Biswas, B., Carlton, R., Jensen, N.C., Creed, G.J., Zullo, S., and Adhya, S. 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 93(8), 3188.
64. Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., and Morris, J.G. Jr. 2001, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45(3), 649.
65. Biswas, B., Adhya, S., Washart, P., Paul, B., Trostel, A.N., Powell, B., Carlton, R., and Merrill, C.R. 2002, *Infect. Immun.*, 70(1), 204.
66. Pirisi, A. 2000, *Lancet.*, 356(9239), 1418.
67. Hagens, S., and Blasi, U. 2003, *Lett. Appl. Microbiol.*, 37(4), 318.
68. Projan, S. 2004, *Nat. Biotechnol.*, 22(2), 167.
69. Schoolnik, G.K., Summers, W.C., and Watson, J.D., *Nat. Biotechnol.*, 22(5), 505.
70. Soothill, J., Hawkins, C., Anggard, E., and Harper, D. 2004, *Lancet Infect. Dis.*, 4(9), 544.
71. Sutherland, I.W., Hughes, K.A., Skillman, L.C., and Tait, K. 2004, *FEMS Microbiol. Lett.*, 232, 1.
72. Dabrowska, K., Switala-Jelen, K., Opolski, A., Weber-Dabrowska, B., and Gorski, A. 2005, *J. Appl. Microbiol.*, 98, 7.
73. Gorski, A., and Weber-Dabrowska, B. 2005, *Cell. Mol. Life Sci.*, 62, 511.
74. Weber-Dabrowska, B., Mulczyk, M., and Gorski, A. 2003, *Transplant Proc.*, 35(4), 1385.
75. Broxmeyer, L., Sosnowska, D., Miltner, E., Chacon, O., Wagner, D., McGarvey, J., Barletta, R.G., and Bermudez, L.E. 2002, *J. Infect. Dis.*, 186(8), 1155.
76. Smith, H.W., and Huggins, M.B. 1982, *J. Gen. Microbiol.*, 128(2), 307.
77. Liu, M., Deora, R., Doutalov, S.R., Gingery, M., Eiserling, F.A., Preston, A., Maskell, D.J., Simons, R.W., Cotter, P.A., Parkhill, J., and Miller, J.F. 2002, *Science*, 295, 2091.
78. Schuch, R., Nelson, D., and Fischetti, V.A. 2002, *Nature*, 418(6900), 884.
79. Bradbury, J. 2004, *Lancet*, 363(9409), 624.
80. Liu, J., Dehbi, M., Moeck, G., Arhin, F., Bauda, P., Bergeron, D., Callejo, M., Ferretti, V., Ha, N., Kwan, T., McCarty, J., Srikumar, R., Williams, D., Wu, J.J., Gros, P., Pelletier, J., and DuBow, M. 2004, *Nat. Biotechnol.*, 22(2), 185.
81. Miedzybrodzki, R., Fortuna, W., Weber-Dabrowska, B., and Gorski, A. 2005, *Virus Res.*, 110, 1.