

WO 2010/064044 A1

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization

International Bureau



(43) International Publication Date

10 June 2010 (10.06.2010)

PCT

(10) International Publication Number

WO 2010/064044 A1

(51) International Patent Classification:

C12N 7/00 (2006.01) A61K 35/76 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/GB2009/051641

(22) International Filing Date:

3 December 2009 (03.12.2009)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

0822068.3 3 December 2008 (03.12.2008) GB

(71) Applicant (for all designated States except US): ARAB SCIENCE AND TECHNOLOGY FOUNDATION [AE/AE]; PO Box 27272, Sharjah (AE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): JASSIM, Sabah Abdel Amir [GB/AE]; Arab Science and Technology Foundation, PO Box 27272, Sharjah (AE). ABDULAMIR, Ahmed Sahib [AE/AE]; Arab Science and Technology Foundation, PO Box 27272, Sharjah (AE). ABU BAKAR, Fatima [AE/AE]; Arab Science and Technology Foundation, PO Box 27272, Sharjah (AE).

(74) Agent: HEATON, Joanne Marie; 1 St Augustines Place, Bristol Avon BS1 4UD (GB).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,

AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

(54) Title: METHODS FOR BACTERIOPHAGE DESIGN

(57) Abstract: Methods for designing and breeding phages are described. The methods include methods to design phages for previously resistant bacterial strains. The methods described do not use genetic manipulation techniques.

## METHODS FOR BACTERIOPHAGE DESIGN

This invention relates to methods for designing and breeding viruses and to viruses bred by the method. More particularly, the present invention relates to the design and breeding of new bacteriophages, and to the bacteriophages obtained using the method.

Bacteriophages or "phages" represent the largest virus group (Ackermann and Dubow. 1987). Bacteriophages have been found which are may propagation in, and thus infect, most of the common groups of bacteria. Individual host ranges are usually narrow, a property which has been exploited in the epidemiological typing of bacteria, for example, coliphages (a type of T-phage) are bacteriophages that specifically infect *Escherichia coli*. Coliphages, with no specificity for serotype, have been used for a phage-typing scheme for *E. coli* O157:H7 (Ahmed et al., 1987). For rapid detection or identification of O157:H7, Ronner and Cliver (1990) isolated a coliphage specific for *Escherichia coli* O157:H7 from cattle manure samples. This coliphage, designated "AR1", formed turbid pin-point (0.5 mm) plaques on cell lawns of 14 strains of O157:H7 (but not other *E. coli*) and *Shigella dysenteriae*. Although, coliphage AR1 forms plaques on cell lawns of *Escherichia coli* O157:H7, it does not produce visible cell lysis in broth culture (Ronner and Cliver 1990). This may suggest that AR1 is a temperate bacteriophage; whereas lysogenic cells of *E. coli* O157:H7 are immune to super-infection by the same phage. This explains their growth within the turbid pin-point (0.5 mm) plaque centres: the edge of each plaque is clear because most cells undergo lytic infection. Among the cells infected earlier, a few cells will have been lysogenized and will form visible microcolonies in the centre of the plaque. However, the appearance of a series of phage-resistant *E. coli* isolates, which showed a low efficiency of plating against bacteriophage PP01, led to an increase in the cell concentration in the culture (Mizoguchi et al 2003).

In the ecosystem both phages and bacteria are continually evolving, with bacteria becoming phage-resistant and phages evolving to maintain or improve infectivity of host bacteria (Levin et al., 1977; Lenski and Levin, 1985; Bohannan and Lenski, 1997; Mizoguchi et al., 2003). The evolutionary coexistence of phages with bacteria for millions of years granted a natural, very powerful and dynamic, source of antibacterial agents. The main problem which has faced scientists for phage-bacteria interaction is the development of resistance by bacteria against phages, coupled with the difficulty of obtaining sufficient numbers of phages specific for all, or most of the, strains of a bacterial species.

In the last decade many researchers have tried to find phages which are lethal to *E. coli* O157:H7 but not to other strains of *E.coli*. Phage PP01 was previously shown to efficiently and specifically lyse *E. coli* O157:H7 (Morita et al 2002; Mizoguchi et al., 2003), however, host-range mutants have also been reported (Mizoguchi et al., 2003). Tanji et al. (2005) found that a three-phage cocktail worked effectively *in vitro* (aerobically and anaerobically) but phages were not sufficiently optimized to free mice from *E. coli* infection during *in vivo* studies. This addresses the need to use specifically engineered and optimized lytic phages when *in vivo* use of phages is intended.

Phages are highly specific to one strain or few strains of a bacterial species and this specificity makes them unique in their antibacterial action. Therefore, phages have been considered as “smart” antibacterial agents rather than “dummy” ones like antibiotics. The ability of phages to recognise precisely their hosts, renders them favourable antibacterial agents especially because broad-spectrum antibiotics kill both the target bacteria and all the beneficial bacteria present in the farm or in the organism body (Merril et al., 2003). The advantages of using phages against bacteria as lytic agents are numerous. However, the inability to cover all strains of certain bacterial species along with the easy development of evolutionary resistance by bacteria against their phages, have made phage therapy or phage biocontrol unsuccessful (Vieu, 1975) and eventually led to replacement of phage therapy, in most countries, with antibiotic treatment (Barrow and Soothill, 1997).

The efficiency of the *in vivo* use of lytic phages relies mainly on how robust, rapid and specific an action phages are able to exert before the immune system of the body being treated will reduce them below the level of effectiveness. Therefore, it seems that the less robust, unoptimized, phages have less chance to succeed in abolishing *in vivo* bacterial infection than the robust optimized counterparts. Moreover, it seems that the successful *in vitro* challenge of the attacking phages against host bacteria might be limited by the unavailability of plenty of highly efficient and specific phages for challenging each pathogen successfully.

In this regard, Kudva et al (1999) have screened phages that bind to the O157 antigen and against phages that bind to common *E. coli* receptors, such as pili, fimbriae, flagella, LPS cores, and other outer membrane proteins. They found some O157 strains that were resistant to plaque formation by individual phages from which they concluded that the excess mid-range-molecular-weight LPS made by the plaque-resistant *E. coli* O157 strains may accumulate around cells in soft agar and influence phage attachment but diffuse from cells in liquid culture. Therefore, an appropriate length of the O-side chains and an optimal LPS concentration may be necessary to make the receptor available for phage interactions and/or to allow irreversible phage binding (Calendar, 1988).

On the other hand, phage-destroying LPS receptors are well known and in one example the tail spike protein has been fully characterised and functions in both adhesion to the host cell surface and in receptor destruction (Baxa et al., 1996; Steinbacher et al., 1997). Thus, movement of virions in the LPS layer before DNA injection may involve the release and rebinding of individual tail spikes rather than hydrolysis of the O-antigen (Baxa et al., 1996). This would suggest that effective infection might require normal LPS, thus, phage mutations seem to originate by alternation of LPS structure (Mizoguchi et al., 2003) giving a solid clue on the importance of LPS of the outer membrane in controlling the fate of phage attachment and the consequent phage infection of the host cell. Therefore, it can be inferred that the modification of LPS of the outer membrane

of host bacteria may play a key role in controlling the phage-host interaction and consequently control phage infection.

In general phage host interactions are dependent on the binding of tail proteins to specific bacterial surface receptors (Pelczar et al., 1993). It seems that the development of a successful phage against *E. coli* must address the emergence of mutant strains, the phage binding and infection of *E. coli* not being controlled by a single receptor, and the many factors which contribute to phage resistance including alteration or loss of receptors for the target cell envelope (Heller, 1992; Barrow et al., 1998; Biswas et al., 2002; Mizoguchi et al., 2003). Thus, the efficient use of phages to control *E. coli* infections may require isolation of mutant *E. coli*-specific phages that can adsorb to hosts that make shorter O-side chains (Kudva et al., 1999) This could suggest that phages need to be redesigned, namely, bred and “retailored” on the host cells in order to gain newly bred sub-strains of phages which are able to infect previously resistant bacteria and to play an important role in the future phages breeding applications, including the pre-harvest pathogen reduction strategies.

Phage breeding can be defined as the procedures pursued in modifying the physical, kinetic and biological characteristics of bacteriophages, leading to the formation of a newly bred strain or sub-strain. Phage breeding can loosely be categorized into two types; non-genetic and genetic breeding.

By “non-genetic”, as used herein is intended a method whereby the modifications to the phage are induced using culture methodology and reproduction and enhanced or forced natural selection techniques rather than by direct manipulation of the viral genome (“genetic breeding”) by manual deletion/insertion/replacement of nucleic acid sequences which specifically alter the genome of the phage in a pre-selected or well defined manner. The non-genetic method of the invention is environmentally-driven and so mimics natural selection or evolution of the phage by reproducing vast numbers of mixed populations of wild-type phages.

The selection of virus progeny using viricidal agent separation or neutralisation of extracellular virus once the more efficient virus particles have

attached to and/or infected the target cell is known (Jassim et al. 1995; WO 95/23848).

Genetic virus design/breeding which is a genetic manipulation of the virus genome has been reported (Duenas and Borrebaeck, 1995; Rieder et al., 1996; O'Sullivan et al., 1998). However, to date, the genetic breeding of bacteriophages is still in its beginning stages with no rewarding results so far primarily due to the inability to manipulate phage genetics (Barrow and Soothill, 1997; Alisky et al., 1998).

However, the art is silent on a non-genetic method of virus breeding, in terms of modifying host-specificity such that previously phage-resistant bacterial strains become susceptible to phage infection.

It is therefore an object of the present invention to provide a non-genetic, or environmentally-driven, method for breeding bacteriophages which infect previously resistant bacterial strains.

The object of the horizontal breeding techniques of the present invention is to breed new phage progenies by chemical/physical re-adaptation of their host specificities to become lytic to new host bacteria that previously were resistant to the parent phage. By this technique, it is possible to design new phage specificities, non-genetically, toward target host bacteria and convert these phage-negative host cells to phage-positive host cells. This was achieved by an innovative standardization methodology to suit the nature of bacteria in general and *E. coli* in particular. This methodology will serve as a template breed phages against host resistance.

Several chemical substances were used in controlled physical conditions to supplement cultures of target phage-negative *E. coli* bacteria mixed non-specific coliphages to physically/chemically readapt the cell wall and the outer membrane of the target host cells to turn phage-sensitive. The mixture of chemical substances at certain physical conditions was called the "breeding solution". The breeding solution is designed to modify the outer membrane permeability, specificity, receptors exposure, and membrane texture, as well as to change the conformation of the exposed moieties of LPS and teichoic acid, or

to expose some hidden moieties in a non-specific way allowing new chances for the attacking phages to find new spots of recognition. Once the tail fibres and the baseplate of the attacking phage attach quite firmly to the newly recognized moieties, the insertion of their nucleic acids will be triggered immediately to pass through the cell wall into the interior of the bacterial cell and start the lytic infection process. The hypothesis of the current methodology of the invented horizontal breeding is to create an artificially-designed microenvironment, in the breeding solution, for the attacking phages to unusually succeed in infecting a naturally resistant strain of bacteria and produce altered phage progenies that acquired the specificity of the new host. Since most of *E. coli* bacteria are infected already with many lysogenic inert prophages, it is hypothesized that there is a possibility of some kind of genetic or epigenetic interaction between the artificially-driven lytic phages and the prophages, remnants of prophages, or the host DNA itself inside the bacterial cell. It was speculated that this might lead to a gaining of new specificity genes for the phage tail fibres to recognize the new moieties on the outer membrane of the target *E. coli* bacteria.

A large number of horizontal non-genetic breeding protocols were carried out. The design of these protocols was dependent mainly on the concept of modifying, changing, and partially tearing the cell wall of the host bacteria to become artificially susceptible to phage infection. Therefore, many pilot experiments underwent many changing protocols, different concentrations of the reagents used, different physical modifications different incubation time periods, and different chemical combinations used. After a series of time-consuming experiments on a high number of protocols, it was found that 3 protocols showed pretty good success and 1 protocol gave only very mild success.

Accordingly, the present invention provides a method of modifying phage-host specificity, the method comprising incubating phages in a medium comprising of one or more of a chelating agent, a detergent, a surfactant, an enzyme, a lantibiotic, an antibiotic and an agent which destroys cell walls.

Preferably, the invention provides a method of selectively breeding bacteriophages, in which the method comprises the steps of:-

- (a) obtaining large amounts of wild-type phages from at least one natural source by incubating the phages with bacterial hosts to obtain large numbers of phages,
- (b) removing bacterial host cells, to obtain a suspension of phages,
- (c) plating the suspension of phages from step (b) on a lawn of bacterial host cells,
- (d) assessing phage plaques to identify areas of highest phage activity,
- (e) isolating the areas of highest phage activity and isolating phages therefrom,
- (f) culturing the phages isolated in step (e) together with their host bacteria,
- (g) adding a viricidal mixture to the culture media of step (f) to remove free phages from the culture medium,
- (h) plating the viricidally-treated culture medium from step (g) onto a host bacterial lawn and identify plaques,
- (i) removing the plaques showing most virulent phage activity from the plate and isolate the phages therefrom,
- (j) incubating the phages obtained in step (i) in a medium comprising of one or more of a chelating agent, detergent/surfactant, enzyme, lantibiotic, antibiotics and an agent which destroys cell walls,
- (k) isolating the bacteriophages of step (j) and incubating them in a growth medium,
- (l) assessing the infectivity of the bacteriophages of step (k) and culturing those whose specificity has been modified,
- (m) storing the bacteriophages cultured in step (l).

In a preferred embodiment of the method, the bacteriophages are obtained from one or more of animal or bird faeces, animal or bird litter, sewage, soil, or farmyard slurry. More preferably, the bacteriophages are obtained from one or a mixture of camel faeces, quellae litters, pigeons litters, chicken litters, sheep faeces, goat faeces, cattle faeces, cattle manure, cattle farm sewage, farm

soil, water sanitization, regular swimming pools, fish ponds, lakes, oceans, water features, and hospitals.

Preferably, the bacteriophages are specific for one or more of *Escherichia coli*, *Enterbacteriacea spp.*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroides gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Klebsiella pneumoniae* or Gram positive bacteria such as *Staphylococcus aureus* including MRSA, *Streptococcus mutans*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus agalactiae*, Coryneform bacteria, *Mycobacterium tuberculosis*, some strains of *Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni*, water-borne *Vibrio cholerae*, or *Helicobacter pylori*. Most preferably, the bacteriophage infect one or more of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Mycobacterium smegmatis*.

Preferably, step (h) is carried out in the same medium as steps (a) to (f).

Preferably, the medium of step (j) comprises one or more of EDTA, lysozyme, Nisin A and Tween<sup>®</sup> 20. In the most preferred embodiment, all of EDTA, lysozyme, Nisin A and Tween<sup>®</sup> 20 are present in the medium.

In step (a) it is preferred that the phages are incubated in a broth culture medium. The broth may be a selective broth or simply one which promotes or is directed to the culture and growth of the host organism. For example, a tryptone broth is useful in the cultivation and breeding of enterobacteria. In the most preferred embodiment, especially where *E. coli* and coliphages are being grown, Luria broth is used. Optionally, the Luria broth may be supplemented with 10g/l NaCl as in LB-Miller broth.

The host bacteria co-incubated with the phages in step (a) are the bacteria for which a phage is being sought. More than one host strain may be used in the same culture broth. The bacteria may be commercially available strains, clinical isolates, mixtures of strains, crude infected material, or the like. Optionally, the strain may be purified.

In step (b) the bacterial hosts may be removed by conventional methods such as centrifugation, addition of antibacterial compounds, lysis, or combinations thereof. Preferably, the bacteria are removed using a combination of centrifugation and chloroform digestion.

The present inventors noted that adding 1:1 volume chloroform to the supernatant caused 2-3 logs decrease of the phages present in the sample. Taking into account that concentration of some phages might be not more than 3 logs, it was decided that 1:1 volume of chloroform could abolish the chance to discover the low concentration phages within the crude sample mixture. Therefore, it was advantageous to use a 1:10 volume of chloroform: crude solution.

The phages obtained in this way (step (c)) are plated on a lawn of host bacteria which are preferably grown on a solidified version of the same broth as used in step (a). Therefore, in the most preferred example, the host bacterial lawn is formed on a Luria Broth agar plate, supplemented as above.

Areas of high phage activity are identifiable by the nature of the plaque or lysis zone formed in the lawn by the phages. The plaque morphology and growth are assessed and recorded in order to isolate the most virulent phages.

Preferably, the plaques in steps (d) and (h) are assessed for diameter, shape, depth, margin of cut, clarity. The plaques may also be used to assess the biokinetic criteria of the phages, as will be described in more detail below. The biokinetic criteria may be assessed by measuring the number of phages before and after burst of the phages. Additionally, the biokinetics may be assessed using data regarding, *inter alia* the ratio of infectivity, the burst time, and the burst size.

Preferably, in steps (h) and/or (i) the plaques are identified and then further selected by their biokinetic profile.

Optimal phage selection may be obtained by repeating steps (a) to (e) or steps (f) to (i) or both.

The phages obtained in step (d) are then isolated from the plaque and cultured as above. Steps (b) to (e) may be carried out more than once. It has been found preferable to repeat this step in order to optimize the phages obtained for virulence and other biokinetic properties. The phage amplification assay (Stewart et al 1998) has not been used here to avoid the loss of the amplified phages by their adherence to the surface of the used test tubes.

Therefore the present inventors have designed a unique methodology of biokinetic measurement by using a single tube harbouring the whole series of biokinetic reactions without ever changing the tube which is called the "master tube". This crucial innovation was found to be necessary to troubleshoot the setbacks of the traditional biokinetic assays which lack the desired precision as many phages are mistakenly overlooked and removed with changing each reaction tube.

The preferred method for assessing the biokinetics of the phage was as follows. A sample of phage is added to a bacterial culture and incubated before exposure to a viricidal agent, in the incubation vessel. After exposure to the viricidal agent, a surfactant is added to the mixture in the incubation vessel and further incubated. Culture broth is added to the incubation vessel. Samples are removed from the incubation vessel and added to fresh culture medium prior to plating on a bacterial lawn and assessment of plaque morphology. Optionally, a serial dilution may be preformed prior to plating.

Preferably, the phage and bacteria are co-incubated prior to the addition of the viricidal agent for a period less than an hour, more preferably of up to 20 minutes and ideally for a time of between 2 and 20 minutes.

In a preferred embodiment, the phage and bacteria are exposed to the viricidal agent for a period less than an hour, more preferably of up to 20 minutes and ideally for a time of up to 10 minutes.

Preferably, surfactant is added to the incubation vessel containing the phage, bacteria and viricide for a period of less than a minute, more preferably of up to 30 seconds and ideally for a time of up to 10 seconds.

To remove the unwanted phages from the culture broth, a viricidal agent is applied. Virulent phages or phages with improved biokinetic properties which have infected a host bacterial cell are not killed by the application of the viricide, but unbound and non-internalised phages in the broth will be. In the preferred embodiment of the invention, the viricide comprises pomegranate rind extract, iron salts and a detergent or surfactant. For biokinetic determination it is also preferred that the viricide comprises pomegranate rind extract.

The pomegranate is the fruit of a deciduous shrub native to Southwest Asia and has been cultivated in the Caucasus since ancient times. It is widely cultivated throughout Armenia, Azerbaijan, Iran, Turkey, Afghanistan, Pakistan, North India, the drier parts of southeast Asia, Peninsular Malaysia, the East Indies, and tropical Africa and was introduced into Latin America and California by Spanish settlers in 1769, where the pomegranate is now cultivated in parts of California and Arizona for juice production. In the Indian subcontinent's ancient Ayurveda system of medicine, the pomegranate has extensively been used as a source of traditional remedies for thousands of years. For example, the rind of the fruit and the bark of the pomegranate tree is used as a traditional remedy against diarrhoea, dysentery and intestinal parasites while the seeds and juice are considered a tonic for the heart and throat. The astringent qualities of the flower juice, rind and tree bark are considered valuable for a variety of purposes such as stopping nose bleeds and gum bleeds, toning skin, (after blending with mustard oil) firming-up sagging breasts and treating haemorrhoids. Pomegranate juice (of specific fruit strains) is also used as eye drops as it is believed to slow the development of cataracts.

The first step for the phage bio-kinetics is to prepare a potent antiviral (anti-phage) substance capable of neutralizing/destroying the phages without harming the target cells. Hence, infected bacterial hosts will act as a shelter for the phages to escape killing by the antiviral substance, this can partly be achieved as described by WO/1995/023848. Note, the antiviral substance reported in the patent WO/1995/023848 has never been tested for *E. coli* phages and nor on *E. coli* cells.

From the preliminary experiments, it was shown that the antiviral agent from WO/1995/023848, when used against isolated *E. coli* phages was active only for approximately 15 minutes after the preparation. Furthermore, the viricidal assay results obtained were not completely reliable as the neutralizing step (Tween 80) was currently found not efficient enough to completely inactivate the viricidal agent after an exposure contact time of 2, 5 and 10 min. However, since the fundamental objective of bio-kinetics assay is to measure precisely the

contact time, the burst size, and the burst time of the tested phages, therefore it was necessary to apply a sharp cut and completely reliable neutralizing step for the antiviral substance. In this study, it was advantageously found that a new neutralizing solution proved to be 100% effective which is a combination of a specific concentration of Tween 20, instead of Tween 80, with Luria broth that gave the optimal neutralization effect ever done. This combination of LB and Tween 20 at certain ratio proved to act uniquely that neither Tween 20 nor LB could do the same neutralization job alone.

The pomegranate rind extract (PRE) is preferably made as follows. Pomegranate rind is blended in distilled water (25% w/v) and boiled for 10 minutes before centrifuging at 20 000 x g for 30 minutes at 4°C and autoclaved at 121°C for 15 minutes and allowed to cool. The extract is further purified by membrane ultra-filtration at a molecular weight cut-off of 10 000 Da and stored at -20°C until used. A preparation of 13% PRE is generally used which is prepared by diluting 1.3 ml of PRE (25% w/v) with 8.7ml of buffer.

The iron salt is preferably ferrous sulphate ( $\text{FeSO}_4$ ) although other ferrous salts may be used. The detergent/surfactant is preferably a polysorbate surfactant such as Tween®. For biokinetic determination it is also preferred that the detergent/surfactant is a polysorbate surfactant such as Tween®. Most preferably, the detergent/surfactant is Tween® 20. Preferably, the PRE is present at a concentration of between 3.25 and 7.5%, the ferrous sulphate at a concentration of between 0.01 and 0.04%, and the Tween® 20 at a concentration of between 0.1 and 10%.

In the ideal embodiment the viricidal agent is composed of 3.25% pomegranate rind extract (PRE) and 0.01% ferrous sulphate whilst the detergent/surfactant is 1.6% Tween® 20.

The phage specificity may be modified to infect previously resistant strains of the same bacteria, to infect different strains of bacteria, or to infect a different species of bacteria.

In a second aspect of the invention, the method of altering phage specificity may be carried out independently of the phage breeding method.

In a third aspect of the invention, the phages produced by the methods of the present invention are usable in various antibacterial applications. For example, phage biocontrol for pathogenic *E. coli* in livestock at the pre-harvest stages of the production process of plain meat, ground meat, and poultry, prophylactic animal feed with coliphage in drinking water or food, for example using absorbable vegetable capsules filled with phage cocktail, bioprocessing of the machinery and tools used in food industry plants, restaurants, hospitals, in humans postinfection, in animals preslaughter, in foods postharvest, food preservative, food additive slaughter houses as *E. coli* biofilms might form and lead to serious persistent sources of infection, prevent and/or eliminate the biofilms of *E. coli* formed on the surface of urinary catheters, in phage-based rapid diagnostic testing, or in phage therapy for *E. coli* infections either by topical or systematic routes of administration in which the rapid bacterial lysis of the specific action phages can be exerted before the immune system of the host body can be developed.

Embodiments of the invention will now be described by way of example only, with reference to and as illustrated by the following Examples.

#### Materials and Methods

##### *Media*

Luria broth (LB): tryptone 10 g l<sup>-1</sup> (HiMedia, Mumbai, India), yeast extract 5 g l<sup>-1</sup> (HiMedia, Mumbai, India), and sodium chloride 10 g l<sup>-1</sup> (HiMedia, Mumbai, India) at pH 7.2 were used in all the protocols. L-agar (LA), consisted of the above with the addition of 14 g l<sup>-1</sup> agar (HiMedia, Mumbai, India) was used for culture maintenance. Bacterial dilutions from 18 h LB cultures grown at 37°C were carried out in phosphate buffered saline (PBS, Oxoid, UK). For plaque assay, the 'soft layer agar' used was LB prepared in Lambda-buffer [6 mmol l<sup>-1</sup> Tris pH 7.2, 10 mmol l<sup>-1</sup> Mg(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.7H<sub>2</sub>O, 50 µg ml<sup>-1</sup> gelatin (Oxoid, UK)], was supplemented with 4 g l<sup>-1</sup> agar bacteriology No. 1 (HiMedia, Mumbai, India).

##### *Phage vertical breeding*

The first phase of the vertical breeding was a new technique to hunt as many as specific phages in a very short time. One hundred and twenty one phages were hunted and isolated from wild. Then a series of phage optimization steps have been implemented on the isolated wild phages. This kind of optimizations is called vertical breeding as it has bred the same phage to a better sub-strain without changing the host range.

#### *Optimization of phage isolation*

#### *Phage isolation and propagation*

A series of optimization steps have been introduced in order to augment the efficacy and art of phage hunting/isolation techniques. The optimization manoeuvres were taken into account:

- i) The crude phage samples collection was diversified in a way that 1g of 10 different crude samples of camel faeces, quellae litters, pigeons litters, chicken litters, sheep faeces, goat faeces, cattle faeces, cattle manure, cattle farms sewage and farms soil were mixed and called “crude mixture”.
- ii) Samples of crude mixture representing 10 g were placed in 100 ml Erlenmeyer flask with cotton-plugged. Then 80 ml of LB was added and the mixture was inoculated with a total of 10 ml of ten 18 h cultures *E. coli* (1 ml each) clinical isolates or the representative NTCC and ATCC *E. coli* strains.
- iii) After 18 h standing incubation at 37°C, sample of 10 ml was dispensed into a sterile 15-mL plastic culture tubes.
- iv) After centrifugation at 5000 x g for 5 min at room temperature the supernatant transferred into 1.5 ml sterile microcentrifuge. Then

1:10 chloroform to lysate ratio was added with gentle shaking for 5 minutes at room temperature in order to lyse the bacterial cells followed by further 3 min incubation in crushed ice the mixture has centrifuged for at 5000 x g for 15 min at room temperature and the supernatant transferred into a 1.5 ml sterile microcentrifuge tubes which became now the isolated phages mixture.

- v) Then, the produced mixture of the isolated phages was propagated on the desired target bacteria lawn as it is earlier mentioned in the procedure of the phage spot lysis test.

Hence, the present inventors have obtained an ever increasing number of crude mixture- purified and isolated multi-phages covering the high number of the mixed clinical *E. coli* isolates and the reference strains. Accordingly, this will accelerate the identification and hunting of new phages as large number of target host bacteria and potential phage crude samples are mixed in one tube saving time and effort as well as maximising the possibilities of phage hunting.

#### *Production of the transient phage stock*

The mixture of the isolated phages from iv) above was propagated on each target bacterial lawn as mentioned earlier for the phage spot lysis test: phages were propagated from their own lysis zones on the bacterial lawns. Lysis zones, if any, were cut by a sterile scalpel and plunged into 300 µl of Lambda buffer in 1.5 ml sterile microcentrifuge tubes for 20 minutes with intermittent gentle shaking. 1:10 chloroform to lysate ratio was added with gentle shaking for 5 minutes at room temperature in order to elute the phages from the agar and to lyse the bacterial cells. After further 3 min incubation in crushed ice the mixture centrifuged at 5000 x g for 15 min at room temperature and the supernatant transferred in a 1.5 ml sterile microcentrifuge tubes.

The transient phage stock solution should contain approximately  $10^5$  to  $10^7$  PFU ml<sup>-1</sup>.

*Optimization of the phage lytic characteristics*

## Plaque-based optimization

The isolates of wild lytic phages from the transient stocks were propagated with the corresponding host clinical *E. coli* isolates and the representative NTCC and ATCC reference *E. coli* strains using the plate method as follows: Ten folds serial dilutions ( $10^{-1}$  to  $10^{-6}$ ) were made with Lambda buffer for the phage stock solutions by taking 100  $\mu$ l of the phage solution into 900  $\mu$ l of lambda buffer. Transfer of 100  $\mu$ l of each dilution for each phage stock solution into 15 ml volume sterile plastic container contain 100  $\mu$ l of  $10^9$  CFU ml $^{-1}$  of 18 h LB culture of targeted bacteria and incubate at 37°C. After 10 min incubation, the added 2.5 ml of top layer agar cooled to 45°C and poured over L-agar plates. Plates were incubated overnight at 37°C and plaque morphology, growth characteristics were recorded according to the following parameters:

- a) Diameter (mm) of the plaque.
- b) Shape of the plaque.
- c) Depth of the plaque
- d) Margin cut.
- e) Clarity or turbidity of the plaque.
- f) Plaque visible time.

By conducting a thorough examination of the formed plaques, it was found that only very few out of tens or hundreds of plaques per plate show larger diameters and clearer lysis than the average. The difference in plaque size has long been underestimated and overlooked as it is very slight and hard to notice. The slightly larger plaques proved to be an excellent indicator for the optimization of the phages lytic characteristics by using the vertical breeding. Accordingly, the best 3-5 well-defined, clear, and largest plaques were selected at each run and used according to the above phages purification and propagation program. This has been repeated for 8-10 runs in order to magnify the outcome of the biased selection of the large and clear plaques thus obtaining the ever-largest and the

ever-clearest 3-5 plaques, reflecting the best yet possible enhancement of the lytic characteristics of the bred phages.

#### *Biokinetic-based optimization*

This optional step was carried out on the phages recovered from the 3-5 optimized plaques that resulted from the plaque-based optimization technique. This step was used to choose the phage set which shows the highest biokinetic values given that remarkable differences in the biokinetic values were seen among the tested phage sets which might have been overlooked by previous plaque-based optimization techniques.

One of the main advantages of the current biokinetic tests are that the accuracy of the assay which relies only on a single tube known as "master tube" which is wholly different from all previous biokinetics assays. This novel approach allows estimating phage burst size, burst time, contact time, ratio of infectivity of the isolated or bred phage much more accurately.

The viricidal agent used in this protocol is composed of 400 µl of 3.25% pomegranate rind extract (PRE) and 600 µl of 0.01% FeSO<sub>4</sub> and is active for 45 min after preparation, whilst the neutralizer agent is composed from 8% Tween 20 with contact time of 5-10 sec followed by the addition of LB up to 1 ml total volume.

#### *Design of the biokinetic assay:*

The above viricidal agent alongside with the neutralizing materials proved to be perfect phage destroying and neutralizing substances respectively without harming the target cell "*E. coli*".

The innovative single master tube biokinetic protocol was conducted as follows:

10 µl ( $10^{12}$  PFU ml<sup>-1</sup>) of phage + 10 µl of bacteria ( $10^5$  CFU ml<sup>-1</sup>) → contact time 2, 5, 10, 15, and 20 min → 100 µl viricidal agent, exposure time 10 min → 200 µl of 8% Tween 20 contact time 5-10 sec → 680 µl of LB were added to make it up to 1 ml → Transfer 10 µl in micro-centrifuge tube containing 900 µl

Lambda buffer, so 10-fold serial dilutions were prepared. From each dilution, 10 µl were spotted on the appropriate bacterial lawn of LA at timely intervals; zero, 10, 20, 30, and 40 minutes past the neutralization step to recover the formed plaques before and after the burst of the new phage progenies. The plates were then incubated at 37°C for 18 h.

*Interpretation of the biokinetic assay:*

The interpretation of the results was classified into two eras; the pre-burst era and post-burst-era. At the pre-burst era, the number of the plaque forming units (PFU) or plaques is equal to or less than the number of the bacteria used in the test for the given dilution. In this era, each plaque was formed by lysis of one bacterial cell releasing high number of phage progenies *in situ* leading to formation of a plaque. That means each bacterial cell sheltered certain number of replicating phages which will then form a plaque.

The time after the burst time is considered as post-burst era. In this era, each plaque represents a new phage progeny which was released in the master tube before spotting onto the lawn. Hence in this assay plaques represent two meanings according to the pre- or post- era of the assay.

Therefore the interpretation will be as follows:

Phage binding time (PBT): The time for the encounter between bacterial hosts and their specific phages that gives the highest number of phage particles at the pre-burst era or yields the highest infective ratio.

Infective ratio (IR): it is the ratio between the number of phage particles at the pre-burst era and the number of the bacterial hosts used in the assay.  $IR = \frac{\text{No. of phage particles in the pre-burst era at a given dilution}}{\text{No. of the bacterial hosts used in the assay at the same given dilution}}$ . The closer number of plaques in the pre-burst era to the bacterial titre used, the higher the IR.

Burst time (BT): it is the time measured before a sharp increase was observed in the number of the formed phage particles more than the number of the bacteria used for the given dilution. In other words, it is the time when the

new phage progenies became responsible for the formation of plaques rather than their infected host cells.

Burst size (BS): The number of new phage progenies per one bacterial cell host. BS= No. of phage particles at the post-burst era / No. of the phage particles at the pre-burst era for the given dilution.

#### *Formation of the optimized definitive phage stocks*

The elite phages were propagated from the best of the vertically-bred plaques using the above described plaque-based and/or biokinetic-based novel optimization methods. Lambda buffer was used as the recovery medium. Definitive phage stocks or the optimized phage stocks were developed on their appropriate host strains by a plate lysis procedure essentially equivalent to growing bacteriophage Lambda-derived vectors (Ausubel et al. 1991). Briefly, preparation of large volume of the optimized phages was conducted by using the soft layer plaque technique and as follows: An aliquot (100 µl) of the phage sample (10-fold serially diluted with lambda-buffer) was mixed with 100 µl of an overnight LB culture of *E. coli* clinical isolates and/or representative *E. coli* reference strains in a sterile Eppendorf micro-centrifuge tube (polypropylene; 1.5 ml; Sarstedt) and incubated for 10 min at 37°C to facilitate attachment of the phage to the host cells. The mixture was transferred from the Eppendorf micro-centrifuge tube to a 5 ml Bijou bottle and then 2.3 ml of 'soft agar' was added (LB prepared in lambda-buffer and supplemented with 0.4% w/v agar bacteriology No. 1 Oxoid which had been melted and cooled to 40°C in a water bath). The contents of each bottle were then well mixed by swirling, poured over the surface of a plate of LA and allowed to set for 15 min at room temperature. The plates were incubated for 18 h at 37°C, and a plate showing almost confluent plaques was used to prepare a concentrated phage suspension by overlaying with 5 ml of lambda-buffer [titre 10<sup>12</sup> plaque-forming units per ml (PFU)]. The final purification process used 1:10 chloroform to lysate ratio to separate the bacteriophage from the bacterial cells. The phage stocks were maintained in lambda-buffer at 4°C.

*Horizontal breeding (chemical/physical re-adaptation of the phage-host specificity)*

**EXAMPLE 1: Tween-20-based breeding**

Tween 20 (Merck, Germany), also known as polysorbate 20, was used in the standardisation trials. Tween 20 is considered an active substance against proteins and lipids but, unlike ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), it lacks a potent chelating potential for cations which are considered one of the main pillars of the cell membrane solidity. Different concentrations of Tween 20 were tested in the horizontal breeding technique it was found that 1.6% of Tween 20 was the optimal concentration achieved and as follows:

Transfer 200 µl of 8% Tween 20 to 800 µl of an 18 h LB culture of *E. coli* clinical isolates and/or the representative NTCC and ATCC reference *E. coli* strains in a sterile Eppendorf micro-centrifuge tube (polypropylene; 1.5 ml; Sarstedt). Therefore the final concentration of Tween 20 is 1.6%. Then 200 µl of total 20 isolates of wild coliphages were added in a quantity of 10 µl ( $10^{12}$  PFU ml<sup>-1</sup>) per a phage and incubated at 37°C. After 18 h, 100 µl of 10 strengths of LB were added followed by the addition of 10 µl of each of the used 20 phage stocks and a loopful of 18 h LA culture of the same target bacteria was added too. This was repeated for 10 days progressively.

At day 10, thin bacterial lawns of the same target bacteria were prepared and 10 µl of the Tween 20-treated phages were added on bacterial lawns and then incubated at 37° C and plaques were observed after 6 h and 18 h. The detection of phage presence was based on visual appearance of lysis zone at the site of 10 µl solution added onto the surface of the lawn. Positive results were expressed by either clear or semi-clear (turbid) lysis zone while negative results were expressed by the absence of such lysis zones.

Results were shown as very mildly successful. Lysis spots of the harvested Tween 20-treated phages revealed very slight progress by contrast of negative result from untreated phage.

### EXAMPLE 2: EDTA-Tris buffer-based breeding

EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid) is believed to act strongly on the outer cell membrane of *E. coli*, increasing the permeability of the membrane. This is one of the necessary requirements for successful cross linking of EDTA with phage and bacteria.

Since EDTA could be lethal to the bacteria at certain levels (Loretta, 1965) different concentrations of EDTA were prepared and a sub-lethal concentration of EDTA on the tested *E. coli* bacteria was used. From a series of lengthy standardization trial and error experiments, it was found that supplementing of Tris-HCl buffer at a concentration of 12 mM with 1 mM EDTA, the bacterial survival rate after two hours in the solution was not affected by the EDTA, therefore, this preparation was considered to be tested and used for the phage breeding assays as follows:

Transfer 1ml of 8h LB cultures of *E. coli* clinical isolates and the clinical isolates or the representative reference *E. coli* strains into 1.5 ml sterile microcentrifuge tubes and centrifuged for 10 min at 5000 x g at room temperature. The supernatant was discarded and pellets were resuspended with 1 ml of 12 mM Tris-HCl (Sigma, USA) buffer (pH 8) and 1 mM EDTA (Merck, Germany) solution then incubate for 10 min at room temperature. The mixture was centrifuged for 10 min at 5000 x g at room temperature. The supernatant was discarded and the pellets were resuspended with 1 ml of LB supplemented with 200 µl of 20 different vertically bred coliphages, each phage represented in 10 µl 10<sup>12</sup> PFU ml<sup>-1</sup> and incubated at 37°C. After 18h, the mixture of 20 phages and the pre-treated Tris-EDTA bacteria was centrifuged at 5000 x g at room temperature for 10 minutes and the resulting bacterial pellets was discarded and the supernatant added to a freshly treated Tris-EDTA bacterial pellets have prepared as above. This procedure has been repeated continuously for 10 successive days.

### EXAMPLE 3: EDTA- lysozyme in Tris - phage breeding technique

The main objective of the phage breeding techniques pursued was to facilitate phage recognition and clipping onto bacterial cell wall. Crippling of the bacterial cell wall was achieved by using lysozymes.

Standardizing tests were performed in order to establish the optimal breeding formula of lysozyme-EDTA sub-lethal crippling of *E. coli* cell wall to facilitate the phage clipping and nucleic acid injection into host bacteria. Standardization was categorized into two groups; lysozyme-EDTA action takes place within LB culture directly, and lysozyme-EDTA action takes place with 12 mM Tris-HCl buffer. At both sets of experiments, 1mM EDTA was used and as follows:

Transfer 100 $\mu$ l of 10, 15, 50, 100, 500, 1000, 1500, 2000, and 3000 $\mu$ g ml<sup>-1</sup> of lysozyme (Sigma, USA) prepared in distilled water into 1.5 ml sterile microcentrifuge tubes containing: (1) 900  $\mu$ l of 8h LB cultures of *E. coli* clinical isolates and the representative reference *E. coli* strains, supplemented with 1mM EDTA or (2) 900  $\mu$ l of 1mM EDTA and 12 mM Tris-HCl buffer (pH 8) contain bacterial pellets of 8h LB cultures, *E. coli* clinical isolates and *E. coli* ATCC strains, prepared as above (2. EDTA-Tris buffer-based breeding). Therefore the final lysozyme concentrations in both above mixture are 1, 1.5, 5, 10, 50, 100, 150, 200, and 300  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>, respectively.

Final concentrations of lysozyme-supplemented EDTA-LB culture were incubated at 37°C for 18 h were studied. The results from the viable plate count (CFU) revealed that the lysozymic activity of all above mentioned concentrations was insufficient to inhibit the growth of all bacterial strains. In contrast, EDTA at 1 mM, Tris-HCl buffer at 12 mM combined with lysozyme at 200 and 300 mg ml<sup>-1</sup> was sufficient to totally inhibit the growth of the tested bacterial strains at pH 8.0. Whilst, only 1-2 logs reduction of CFU observed with all strains in the presence of lysozyme at 150 mg ml<sup>-1</sup>. Therefore, this concentration was considered as a sub lethal dosage in which the bacterial cells undergo partial destruction of the cell wall to a limit sufficient for surviving. This status is considered ideal for exposing bacteria to a high number of phages that their clipping activity is optimized as bacterial cell wall became brittle.

Therefore, the final formula of the lysozyme-EDTA-Tris phage breeding solution was as follows:

Transfer into 1.5 ml sterile microcentrifuge tubes 600 µl of 20 mM (final concentration 12mM) Tris-HCl buffer (pH 8), 100 µl of 10 mM EDTA (final concentration 1 mM), 100 µl of 1.5 mg ml<sup>-1</sup> of lysozyme (final concentration 150 µg ml<sup>-1</sup>), 100 µl of 18 hr LB culture of *E. coli* (1x10<sup>9</sup> CFU ml<sup>-1</sup>) and 200 µl of a mixture of different 20 phages (10<sup>12</sup> PFU ml<sup>-1</sup>) mixed gently and incubated at 37°C for 10 days with subsequent addition of loopful of 18 h LA culture of *E. coli* and 100 µl of the desired phages (10<sup>12</sup> PFU ml<sup>-1</sup>) every 3 days.

The aim of this technique is to find out whether there will be a new bred phage(s) appeared at the end of the 10 rounds of breeding. Mixing of high number of 20 or more different phage strains with high number of crippled bacteria together at favourable long lasting breeding conditions might largely favour the clipping of phages onto *E. coli* EDTA-caused porous and brittle outer membranes as well as facilitate the nucleic acid injection of phages into the interior of the bacterial host through brittle and highly porous cell wall (due to the effect of EDTA + lysozyme). The advantage of using lysozyme-EDTA over the EDTA alone in the horizontal breeding might be justified that the lysozyme-injured cell wall could allow the loosely attached phages to the outer membrane to inject the nucleic acid successfully in a way difficult to occur when the cell wall was intact.

#### EXAMPLE 4: EDTA- Nisin A in Tris - phage breeding technique

The present inventors tested Nisin A in the phage breeding techniques for *E. coli* bacteria.

After lengthy pilot studies, the optimal Nisin A (Sigma, USA) concentration was determined after a series of 6 serial dilutions, 0.1 µg ml<sup>-1</sup>, 1 µg ml<sup>-1</sup>, 10 µg ml<sup>-1</sup>, 100 µg ml<sup>-1</sup>, 200 µg ml<sup>-1</sup>, and 400 µg ml<sup>-1</sup>. The breeding mixture used was composed of the above mentioned dilutions of Nisin A at 20 mM Tris, 20 mM EDTA and 1% Tween 20. It was shown that the concentration of a 200 µg ml<sup>-1</sup> of Nisin A and above showed a remarkable antibacterial activity against the Gram

negative *E. coli* bacteria. Hence, 100-150 µg ml<sup>-1</sup> was decided to be used as the breeding concentration of Nisin A which is able to weaken the *E. coli* cell wall without a remarkable bacterial destruction. The phage breeding mixture formula was as follows:

Transfer into 1.5 ml sterile microcentrifuge tubes 850 µl of 23.6 mM (final concentration 20 mM) Tris-HCL buffer (pH 8), 20 µl 1000 mM (final concentration 20 mM) EDTA, 10 µl Tween 20 (final concentration 1%), 10 µl of 8hr LB culture of *E. coli* (1x10<sup>9</sup> CFU ml<sup>-1</sup>), 10 µl of a mixture of high titre 20 desired phages (10<sup>12</sup> PFU ml<sup>-1</sup>) and 100 µl of 1.5 mg ml<sup>-1</sup> (final concentration 150 µg ml<sup>-1</sup>) of Nisin A. Mixed gently and incubated at 37°C for 10 days with subsequent addition of loopful 18 h LA culture of *E. coli* and 10 µl of the desired phages (10<sup>12</sup> PFU ml<sup>-1</sup>) every 3 days.

#### *Transmission electron microscopy*

Transmission electron microscopy (TEM) described by Jassim et al. (2005) was used for some selected phage suspensions with minor modification in brief: 10-20 µl of 2% aqueous phosphotungstic acid (adjusted to pH 7.3 using 1N NaOH) were applied on the phage-adsorbed grids and left on for 3-5 minutes. Then excess fluid was drawn off from the edge of the grid with filter paper. Then electron microscopy was viewed on a Philips CM 200 (Philips Electronics, Holland) at magnifications ranged from 75000X to 160000X.

Since the present invention has designed hundreds of phages and viewing all phages by TEM to get an overall outlook for the characteristics, physical attributes, and the classification of the involved phages are extremely costly and time consuming, representative phage isolates were selected according to two parameters:

1. The host bacterial *E. coli* strain (Generic or EHEC strains).
2. The geographical area where the phage was isolated.

The phage samples chosen for viewing were arranged in two ways:

- a) Pure phage suspensions composed of  $2 \times 10^9$  PFU ml<sup>-1</sup> of phage particles in lambda buffer solution.
- b) Mixed phages-bacteria complexes to disclose the direct contact sites and view the phage interaction directly with the relevant host bacterial cell was carried-out according to Schade et al. (1967) method and in brief as follows: Bacteria were grown to  $2 \times 10^6$  CFU ml<sup>-1</sup> in LB at 37°C to produce well-flagellated host cells. A pre-warmed (37°C) 500 µl sample of  $2 \times 10^9$  PFU ml<sup>-1</sup> of phage isolate in LB was transferred to 15 ml sterile test tube containing 4.5 ml of  $2 \times 10^6$  CFU ml<sup>-1</sup> of 6 h LB culture of an appropriate *E. coli* strains to obtain ratio of 100:1 phage : bacteria. Adsorption was allowed to occur with gentle rotary shaking 30 rev min<sup>-1</sup> at 37°C for 5 minutes. The incubation was terminated by swirling the test tube in ice to chilled bacteria-phage mixture and then the mixtures were filtered through Whatman (Whatman PLC., UK) syringe sterile filter membrane 25mm/0.22 µm units. The filter washed 3 times with 1 ml of chilled lambda buffer and finally transferred into 15 ml sterile test tube and whereas the trapped bacteria-phage complexes were recovered from filter by gentle hand shaking with 3 ml of the chilled lambda buffer to be ready for negative staining and TEM viewing.

## Results

### *Isolation and characterization of E. coli.*

Four hundred and thirty, 430, clinical isolates of diagnostically-proven pathogenic *E. coli* bacteria were retrieved from hospital inpatients (microbiology laboratories, Hospital Serdang and Hospital Kajang in Selangor, Malaysia) from documented sporadic cases of haemorrhagic colitis, non-haemorrhagic colitis, urinary tract infections, infected wounds, vaginitis and bacteremic cases. Several morphologically distinct types of colonies were apparent on the LA plates used for determining the bacterial cell count. Representative samples of each were transferred with sterile toothpicks into liquid LB broth. The isolates were re-

checked and identified by using Microbact GNB 12A system (Oxoid, UK) with 99% confirmatory diagnosis for *E. coli*. In addition, EHEC isolates were identified by using sorbitol MacConkey agar test. It was found that 413 (96.05%) of the involved clinical isolates fermented sorbitol, namely, they are non-EHEC, save for 17 clinical isolates (3.95%) (Table 1) were sorbitol non-fermenter, therefore, they were considered as EHEC.

All *E. coli* clinical isolates and reference *E. coli* NTCC 129001, NTCC 9001, ATCC 12810, ATCC 12799, ATCC 25922, and ATCC 35218 strains were subjected to be the host targets for the isolation of wild phages, phage redesign and breeding (Table 1).

#### *Phage isolation, optimization, and redesign techniques*

One hundred and forty nine (149) highly lytic and specific *E. coli* phages isolates have been retrieved from wild and redesigned *via* vertically breeding (gain optimization), and/or horizontally bred (earn new specificity). 121 phages have been vertically bred (Table 1) whereas 19 phages were developed from 6 reference strains (NTCC 129001, NTCC 9001, ATCC 12810, ATCC 12799, ATCC 25922, and ATCC 35218), 92 phages were developed with 143 non-EHEC clinical isolates, 10 phages were obtained from 10 EHEC clinical isolates cultures and 13 phages for EHEC represent 10 phages from clinical isolates and 3 phages developed on one single EHEC NTCC 129001.

However, some phages were found completely resistant to culture on various *E. coli* strains have been developed further to gain prototype highly specificity *via* horizontal breeding techniques (Table 1) whereas 22 phages were obtained from 22 *E. coli* strains (16 non-EHEC and 6 EHEC) and 6 phages were bred on 5 reference strains non-EHEC and 1 EHEC. In general, the total phages have been successfully horizontally bred and yielded with highly prototype specificity were 28 phages in which 7 phages are EHEC-specific phages and they did not respond to the vertical breeding techniques.

Accordingly, a huge coliphage mixture was built gradually and called phage master mix. Upon the build up of phage master mix, an increasing number

of the bacterial isolates were immediately recognized and lysed by this mixture without the need to isolate or breed new phages therefore the number of the isolated/bred phages, 149, is smaller than the total number of host cells, namely the clinical isolates and the reference strains. When the phage master mix was finally composed of 149 phage isolates, it covered >95% of any given number of pathogenic *E. coli* isolates see Table 1, which shows the demographic estimates of the *E. coli* clinical isolates, reference *E. coli* strains, crude samples for phage isolation, and the bred phages developed.

The retrieved phage isolates showed a remarkable variation in the plaques morphology, plaques size, plaques clarity, phage titre, and other phage biokinetic tributes. However, since there is a possibility of *E. coli* strain overlapping among the studied bacterial isolates.

TABLE 1

The clinical isolates	<p>- Total <i>E. coli</i> number: 430        No. of non-EHEC isolates: 413</p> <p>No. of EHEC isolates: 17</p> <p>% of EHEC isolates: 3.95%</p> <p>Source of isolates: 70% stool of patients, 30% (urine, blood and vagina) of human patients.</p> <p>-No. of isolates yielded new phages by vertical breeding: 153        - 143 non-EHEC        - 10 EHEC</p> <p>- No. of isolates yielded new phages by horizontal breeding: 22 out of 24 clinical isolates underwent horizontal breeding:        - 16 out of 17 non-EHEC        - 6 out of 7 EHEC</p> <p>-Total No. of clinical isolates yielded new phages by both vertical and horizontal breeding: 153 +22, respectively, = 175</p> <p>- The rest of isolates 241 were readily covered by phages produced and bred from the above 175 isolates</p> <p>- Total no. of covered isolates by bred phages: 175 + 241 = 416</p> <p>- The final resistant isolates: 430-416= 14 isolates only</p> <p>- % of covered <i>E. coli</i> isolates by bred phages: 96.7%</p>
-----------------------	--

The reference strains	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Total no.: 6 reference strains.</li> <li>- Non-EHEC: 5 strains (NTCC 9001, ATCC 12799, ATCC 12810, ATCC 25922, and ATCC 35810)           <ul style="list-style-type: none"> <li>- NTCC 9001: yielded 7 vertically bred phages and 1 horizontally bred phage.</li> <li>- ATCC 12810: yielded 3 vertically bred phages and 1 horizontally bred phage.</li> <li>- ATCC 12799: yielded 2 vertically bred phages and 1 horizontally bred phage.</li> <li>- ATCC 25922: yielded 2 vertically bred phages and 1 horizontally bred phage.</li> <li>- ATCC 35810: yielded 2 vertically bred phages and 1 horizontally bred phage.</li> </ul> </li> <li>- EHEC strains: 1 strain (NTCC 129001)</li> <li>- NTCC 129001: yielded 3 vertically bred phages and 1 horizontally bred phage.</li> </ul>
The crude samples for phage isolation	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sources: animal stool (sheep, cow, horses, camel, quell, chicken, birds), manure, soil, and sewage.</li> <li>- No. 113 different crude samples</li> <li>- Each 8 samples mixed together to form crude mixtures</li> <li>- Each run: mixing of a crude mixture, composed of 8 crude samples + 10 (or more) clinical <i>E. coli</i> isolates</li> </ul>
The bred phages	<ul style="list-style-type: none"> <li>- No. of phages: 140 <i>E. coli</i> specific phages developed from the clinical <i>E. coli</i> isolates and from the reference strains</li> <li>- 121 phages were isolated and vertically bred.</li> <li>- 19 phages isolated/vertically bred from 6 reference strains, 3 of which isolated from EHEC reference strain.</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"><li>- 92 phages isolated/vertically bred from 82 non-EHEC clinical isolates.</li><li>- 10 phages isolated/vertically bred from 10 EHEC clinical isolates.</li></ul>
	<ul style="list-style-type: none"><li>- 28 phages were horizontally bred successfully from 30 <i>E. coli</i> bacteria</li></ul>
	<ul style="list-style-type: none"><li>22 phages were bred from 16 non-EHEC and 6 EHEC isolates. -</li></ul>
	<ul style="list-style-type: none"><li>6 phages were bred from reference strains (5 non-EHEC and 1 EHEC). -</li></ul>
	<ul style="list-style-type: none"><li>7 phages out of the above-mentioned 28 horizontally bred phages were EHEC-specific phages. -</li></ul>
	<ul style="list-style-type: none"><li>- The success rate of the horizontal breeding: <math>28/30 = 93.3\%</math></li></ul>
	<ul style="list-style-type: none"><li>- The total No. of the EHEC-specific phages isolated, vertically bred, and horizontally bred: <math>13+7 = 20</math> phages</li></ul>

### *Vertical breeding*

The phages that have been isolated and bred from the reference generic *E. coli* NTCC 9001, ATCC 12810, ATCC 12799, ATCC 25922, and ATCC 35218 strains were numbered and abbreviated as (G) and the phages isolated from the reference EHEC *E. coli* NTC129001 strain were numbered and abbreviated as (H), while the phages isolated and bred from the clinical isolates were numbered according to the relevant clinical isolate. See Table 2A which shows the vertical breeding and optimization of different phages isolated from wild and bred on five non-EHEC reference strains and one EHEC reference strain showing optimized plaque and biokinetic values, and Table 2B which shows the difference between the observation frequency of clear (CL) and semi-clear (SC), semi-turbid (ST), and turbid (TR) plaques before and after vertical breeding.

The results of the vertical breeding and optimization for the isolated phages were highly promising in terms of the phage plaque criteria and in the phage biokinetic values. Since the biokinetic values, the burst time (BT) and the optimal phage binding time (PBT) showed no remarkable differences before and after breeding, only the burst size (BS) and the infective ratio (IR) were shown in Tables 2 and 3.

Regarding the phages isolated and vertically bred from the reference NTCC and ATCC strains of *E. coli*, it was found that the mean of the phage plaque size before breeding, 1.87 mm, is much lower than that of the optimized phages, 4.26 mm ( $P<0.01$ ), Table 2A. The observed clarity of the plaques in the post-breeding phages was associated more with clear (CL) plaques than the pre-breeding phages ( $P<0.01$ ), Table 2B. The mean of the burst size (BS) in the pre-breeding phages, 174.1, was lower than that of the post-breeding phages, 288.47 ( $P<0.01$ ), Table 2A. And the mean of the infective ratio (IR) of the pre-breeding phages, 79.93, was lower than that of the post-breeding phages, 91.32 ( $P<0.01$ ), Table 2A. The results obtained from the vertical breeding on the clinical *E. coli* isolates was similar to that obtained from the vertical breeding of the reference *E. coli* strains. See Table 3 which shows vertical breeding and optimization of different phages bred on 153 *E. coli* clinical isolates that

composed of 143 non-EHEC and 10 EHEC. Moreover, the increments in the IR, BS, and plaque size values after the breeding were correlated positively with each other. It was found that the correlation coefficient between the increments of IR and BS was  $r = +0.4$ , and between the increments of BS and plaque size was  $r = +0.35$ , and between the increments of IR and plaque size was  $r = +0.3$  ( $P < 0.05$ ). This provided further consistency of our optimization techniques that three parameters for the phages lytic cycle optimized similarly and correlated with each other significantly. The harmony in the optimization of these parameters, namely, the infective ratio, the burst size, and the plaque size represents that the optimized phages have been enhanced in respect to their host infectivity, their replicative potential inside the host, and their lytic activity as well.

**TABLE 2A**

Reference strain of <i>E. coli</i>	Type the of reference strain	Crude specimen of the phage	Phage name	Before breeding				After breeding			
				Plaques		Biokinetic		Plaques		Biokinetic	
				Size (diameter; mm)	Clarity	IR (%)	BS	Size (diameter; mm)	Clarity	IR (%)	BS
NTCC 9001	Non-EHEC	Camel stool	2G	2	SC	94	81	5.5	CL	97	255
		Pigeon litter	4G	3	CL	89.3	232	6.5	CL	94.3	316
		Chicken litter	5G	4	SC	88.6	130	7	CL	95.1	278
		Sheep stool	6G	3	CL	90	108	6	CL	98	315
		Manure	8G	5	ST	75	73	7	CL	89.8	219
		Chicken litter	9G	2.5	SC	43	130	6	CL	85	287
		Chicken litter	10G	2	SC	82.2	148	4	CL	94	294
ATCC 12810	Non-EHEC	Sheep stool	11G	Invisible 0.1	TR	68.4	187	2	SC	84	305
		Cow stool	12 G	1	ST	72.7	213	2.5	SC	82.5	288
		Goat stool	13G	1.5	SC	86.1	246	3	CL	90.2	324
ATCC 12799	Non-EHEC	Farm soil	15G	Tiny 0.3	ST	72.8	153	2	CL	88.6	276
		Chicken litter	16G	1.5	SC	83.5	231	4	SC	94.2	284

ATCC 25922	Non- EHEC	Quell litter	20G	2.5	CL	91.7	286	5	CL	95.8	304
		Chicken litter	21 G	2.5	SC	88.3	245	5	CL	93.9	295
ATCC 35218	Non- EHEC	Sheep stool	24G	2.5	CL	91.2	268	4	CL	95	326
		Manure	25G	2	SC	85.6	274	4	CL	93.1	286
NTCC 129001	EHEC	Pigeon litter	4H	Invisible 0.1	TR	78.8	101	2	CL	87.3	273
		Chicken litter	9H	Invisible 0.01	TR	65.8	110	3	CL	86.9	289
		Sheep stool	10H	Invisible 0.01	TR	71.7	92	2.5	CL	90.4	267

-CL: clear plaque    -SC: semi-clear plaque    -ST: semi-turbid plaque

-TR: Turbid plaque    -BS: Burst size    -IR: infective ratio

**TABLE 2B**

Variables	CL	SC, ST, TR	Total
pre-breeding	4	15	19
Post-breeding	16	3	19
Total	20	18	38

-CL: clear plaque    -SC: semi-clear plaque    -ST: semi-turbid plaque

-TR: Turbid plaque    -BS: Burst size    -IR: infective ratio

**TABLE 3**

Phages isolated and vertically bred from non-EHEC clinical isolates only:

No. of phages: 92

No. of clinical isolates: 143

No. of phages showed plaque size increase after the vertical breeding:

- Plaque size (diameter) increase >5 mm: 14 phages
- Plaque size (diameter) increase 4-5 mm: 40 phages
- Plaque size (diameter) increase 2-3 mm: 32 phages
- Plaque size (diameter) increase 0.5-1 mm: 6 phages

Studied parameter	Before breeding	After breeding
Average of the plaque size Significant increase ( $P<0.01$ )	2.3 mm	4.12 mm
Plaques clarity Significant increase ( $P<0.01$ )	37 CL 23 SC 12 ST 11 TR	67 CL 10 SC 4 ST 2 TR
Average of the biokinetic value (IR) Significant increase ( $P<0.01$ )	81.3	92.6
Average of the biokinetic value (BS) Significant increase ( $P<0.01$ )	204.7	316.0

Phages isolated and vertically bred from EHEC *E. coli* clinical isolates:

No. of phages: 10

No. of clinical isolates: 10

No. of phages showed plaque size (diameter) increase:

<p>&gt;5 mm: 0 4-5 mm: 4 2-3 mm: 5 0.5-1 mm: 1</p>		
Parameter studied	Before breeding	After breeding
Average of the plaque size Significant increase ( $P<0.01$ )	1.8 mm	3.7 mm
Plaques clarity Significant increase ( $P<0.01$ )	2 CL 3 SC 2 ST 3 TR	6 CL 2 SC 2 ST 0 TR
Average of the biokinetic value (IR) Significant increase ( $P<0.01$ )	77.4	89.2
Average of the biokinetic value (BS) Significant increase ( $P<0.01$ )	211.8	286.5

-CL: clear plaque -SC: semi-clear plaque -ST: semi-turbid plaque

-TR: Turbid plaque -BS: Burst size -IR: infective ratio

#### *Phage biokinetics*

Phage growth was characterized by the latency period, the burst size and by the percentage of adsorption to the host cells after 1, 5, 10 and 15 min (determined all in modified one-tube growth experiments).

The results showed that all isolated phages from the vertical breeding (Tables 1 and 2) have an optimal phage binding to host cell of 5 to 10 min with the burst time of 25 to 40 min with non-significant difference between the phages before and after breeding ( $P>0.05$ ). On the other hand, the burst size showed great

variance among the tested bred phages and showed a significant difference between pre- and post-breeding phages, as mentioned earlier. The minimal burst size was 73 phage particles per a cycle and the maximal burst size was 336 phage particles per cycle. One of the most important parameters of the phage biokinetics is the infective ratio (IR) in which it was found highly variable among the tested phages as well as significantly different between pre- and post-breeding phages, as mentioned earlier. Nevertheless, all *E. coli* strains have shown partial or complete phage lysis resistance have been subjected to a series of phage horizontal breeding process.

#### *Horizontal breeding*

Three horizontal phage breeding techniques were applied on 6 *E. coli* reference strains and on 24 clinical isolates that showed great, unbeatable resistance against all isolated and optimized phages obtained in this study to determine whether these techniques can result in phages conferring new host range specificity. The vital factors that lead to the success of the current horizontal breeding techniques were; (1) using a large number of different wild isolated phages per each run of breeding, (2) using phages were previously vertically bred and highly optimized on other *E. coli* strains, (3) preparing suitable microenvironment conditions for the horizontal breeding techniques to bias the co-evolutionary balance between phages and bacteria towards the phages. In general, it was found that the results from using only a single or a couple of phages against highly phage-negative cultures of *E. coli* were disappointing. Therefore, it was believed that using larger numbers of isolated/optimized phages for single target resistant bacteria would give much better results. Accordingly, 20 highly optimized *E. coli*-specific phages, each being 100% non-specific for the 30 bacterial strains/isolates used, were involved in the three techniques of the horizontal breeding of Examples 2, 3 and 4. These phages were selected as; a) highly optimized coliphages with large clear plaques and high IR%, b) non-specific to any of the reference strains used in the experiments and non-specific to any of the 24 highly phage-resistant clinical isolates, 3)

different phages in terms of plaque morphology and biokinetic criteria. Therefore, 30 reaction tubes of horizontal breeding, each tube contains one target bacteria with 20 phages, were used for each technique of the breeding. The 90 reaction tubes for the 3 used techniques were accompanied with 30 negative control tubes which each contains a mixture of one target bacterium with the same 20 phages in Tris-buffer without adding the horizontal breeding reagents, EDTA, lysozyme, Nisin A, or Tween 20.

Twenty eight new specific phages were obtained towards 28 previously phage-resistant bacteria by using simultaneously 3 horizontal breeding techniques (Tables 4 and 5). All reference strains, five non-EHEC and one EHEC, and 22 clinical isolates, 16 non-EHEC and 6 EHEC bacteria, resulted in one new phage for each, totally 28 phages. Twenty one new phages were produced successfully by only one breeding technique while the rest of phages were produced by two breeding techniques. Nevertheless due to the great similarity between the two phages coming out from the breeding techniques, they were considered as one phage. The results of the horizontal breeding (Table 4 and 5) showed that it is possible to confer new specificity for non-specific phages toward certain target bacteria when favouring breeding conditions are sustained for a long period of time and for many successive runs. The newly bred phages produced initially 1 mm diameter semi-turbid plaques on bacterial lawns, however, with subsequent series of frequent vertical breeding, the plaques diameter have enlarged to 2-3 mm in diameter and furthermore became highly transparent. It was inferred that if one of the breeding techniques had successfully developed a bred phage for a host cell, it doesn't mean that the same protocol will work with other strains and this has inspired to use all three phage horizontal breeding techniques simultaneously for all highly phage resistant *E. coli* strains (Tables 4 and 5). None of the negative control reactions (absence of EDTA, lysozyme, Nisin A, or Tween 20) showed any new phages against any of the 30 resistant *E. coli* strains used. This granted a solid base on the possible mechanisms responsible for the horizontal breeding that required

necessarily the presence of chelating, detergents, and cell wall destroying agents like EDTA, lysozyme, Nisin A, and Tween 20.

Table 4. Horizontal phage breeding on 30 *E.coli* strains: 6 reference strains and 24 clinical isolates.

<i>E. coli</i> strain	Type of <i>E. coli</i>	Chemical treatment		
		EDTA	EDTA-lysozyme	EDTA-Nisin
NTCC 9001	Non-EHEC	-	+	+
ATCC 12810	Non-EHEC	-	+	+
ATCC 12799	Non-EHEC	+	-	-
ATCC 25922	Non-EHEC	-	+	-
ATCC 35810	Non-EHEC	-	-	+
NTCC 129001	EHEC	+	+	-
1	Non-EHEC	+	-	-
2	Non-EHEC	-	+	-
5	Non-EHEC	-	-	+
14	EHEC	-	+	-
31	Non-EHEC	+	-	-
84	Non-EHEC	-	+	-
91	EHEC	-	+	+
78	Non-EHEC	-	-	-
8	Non-EHEC	+	+	-
12	Non-EHEC	-	-	+
22	EHEC	-	+	-
24	Non-EHEC	-	-	+
34	EHEC	-	-	+
48	Non-EHEC	+	+	-

128	EHEC	-	-	-
75	Non-EHEC	-	-	+
111	Non-EHEC	-	+	-
113	Non-EHEC	-	-	+
127	Non-EHEC	-	-	+
133	EHEC	-	+	-
159	EHEC	+	-	-
160	Non-EHEC	-	+	+
180	Non-EHEC	-	+	-
191	Non-EHEC	-	-	+
Total bred phages		7	15	13

Table 5. A summary results of the phage horizontal breeding techniques.

No. of phage breeding protocols used for each <i>E. coli</i> strains	Three protocols: Tris-EDTA phage breeding technique. (a) Tris-EDTA-lysozyme phage breeding (b) technique. Tris-EDTA-Nisin A-Tween 20 phage (c) breeding technique
Total no. of highly resistant, namely, phage negative culture <i>E. coli</i> used	30 <i>E. coli</i> strains - 5 reference non-EHEC strains. - 1 reference EHEC strain. - 17 non-EHEC clinical isolates. - 7 EHEC clinical isolates
No. of the responsive <i>E. coli</i> isolates to horizontal bred phage	28/30
Success rate of phage breeding (%)	93.3%

No. of the responsive <i>E. coli</i> isolates and the success rate for the phage breeding Tris-EDTA	7/30, (23.33%)
No. of the responsive <i>E. coli</i> isolates and the success rate for the phage breeding technique Tris-EDTA-lysozyme	15/30, (50%)
No. of the responsive <i>E. coli</i> isolates and the success rate for the phage breeding technique Tris-EDTA-Nisin A-Tween	13/30, (43.33%)
The Number of phages used in each of the 3 techniques of breeding	20 highly optimized lytic phages were used in mixture and co-cultured with the target resistant isolate
Number of successive days (rounds) of breeding	10 successive days
No. and % of the responsive non-EHEC <i>E. coli</i> to breeding	21/22 <i>E. coli</i> strains 95.45% (5 reference strains and 16 clinical isolates)
No. and % of the responsive EHEC <i>E. coli</i> to breeding	7/8 <i>E. coli</i> strains 87.5% (1 reference strain and 6 clinical isolates)
No. and % of the resistant <i>E. coli</i> bacteria to horizontal breeding	2 <i>E. coli</i> strains 6.6% ( one EHEC and one non-EHEC clinical isolates)

### TEM

From the TEM micrographs, the selected phages showed a great diversity in respect to their physical characteristics (Table 6) and they were classified into different T-series according to Brock (1990). The phage master mix shows a great hybrid of optimized/bred/isolated anti-*E. coli* phages that belong to the all known phage T-series. This ensures the high diversity of the phage mixture

which in turn ensures the highest possible *E. coli* coverage and effectiveness. Eight phages out of ten tested showed tendency to attach to somatic O antigens rather than to flagellar H antigens. Therefore, it is unlikely that the expression of H7 antigen plays a role in plaque resistance since several other O157 non-H7 strains were susceptible to plaque formation by the phages (Kudva et al., 1999; Goodridge et al., 1999 and 2003). It can be inferred that LPS (O antigen) is the most crucial element determining the phage-host specificity, so effective phage infection into resistant host might require modified LPS, namely O antigen. This is supported by Mizoguchi et al., (2003) who revealed that phage mutants seemed to originate by alternation of LPS structure.

Table 6. Classification and characterization of selected designed phages from electron micrographs

Phage bred number	<i>E. coli</i> type	Phage series	Size (nm)	
			Head (Diameter)	Tail
4G	Non-EHEC	T5	95; circular	22
4H	EHEC	T5	102; circular	45
8G	Non-EHEC	T3 or T7	35; circular	45
9H	EHEC	T5	105; circular	63
10H	EHEC	T-even 2,4,6	88; icosohedral	105
175	Non-EHEC	T-even 2,4,6	90; circular	85
115	Non-EHEC	T3 or T7	53; circular	80
131	EHEC	T1	65; icosohedral	85
91	EHEC	T-even 2,4,6	30; circular	80
15G	Non-EHEC	T5	80: oval	55

## Discussion

### *E. coli clinical isolates*

Seventy percent of *E. coli* clinical isolates were obtained from patient stool samples with gastrointestinal tract disorders like diarrhoea, abdominal pain, food poisoning, and enterocolitis whilst, the other 30% were found in patients' urine, blood and vaginal swab samples. Not surprisingly by *E. coli* infection for human beings is usually transferred from the environment and more importantly from surrounding animals. *E. coli* are usually present in the bowel of the warm-blooded animals and particularly in the livestock of cattle, sheep, horses, camels, chicken, cats, dogs and birds (Jackson et al., 1998; Garber et al., 1999; Milne et al., 1999). Disease-causing microbes that have become resistant to drug therapy are an increasing public health problem and *E. coli* O157:H7 and MRSA are examples of the diseases that have become hard to treat with antibiotic drugs.

### *Unprecedented achievements*

The described protocols to produce highly reliable phage or phage cocktail with high specificity able to infect and lyse wide ranges of *E. coli* that cause gastroenteritis in humans including EHEC strains. One of the important steps of the current invention is to calculate the lytic cycle kinetics of the isolated and bred phages. This step is mandatory for the subsequent applications based on the discovered phages, including; phage-based rapid diagnostics, phage-based biocontrol and bioprocessing or in phage therapy for *E. coli* infections. In this invention the present inventors have formulated a new phage biokinetics measurement by using only one single tube of assay.

In the present invention of non-genetic phage designing techniques which succeeded in breeding wild phages to acquire optimized infective traits, "vertical breeding", and to acquire new traits that had never been reported previously, "horizontal breeding". Therefore, the present invention presents first evidence to formulate a phage master mix isolated from the wild environment and

bred/redesigned by the described techniques to cover >95% of all pathogenic *E. coli* strains.

#### *Novel phage vertical breeding and phage biokinetics*

It was postulated that successful phage-based applications for example therapy, bacterial detection, biocontrol and bioprocessing could be achieved by, firstly finding a reliable method of hunting a large number of wild phages in a short time, secondly establishing a method to enhance and promote the lytic characteristics of the isolated phages, and thirdly finding a method to exploit the large number of the optimized isolated phages to infect unrecognized strains by designing new prototype phages with new host specificities. Therefore, two kinds of breeding technologies were designed as described above producing highly optimized *E. coli*- specific prototype phages which cover almost all of the important strains of *E. coli* with more than 3-5 optimized specific phages for each strain.

Analyzing deliberatively the phases of the lytic cycle of each phage is crucial and vital for any phage-based bacterial diagnostic, therapy, biocontrol and bioprocess protocols. Without knowing the biokinetic criteria of phages precisely, it would be impossible to manipulate phages toward the desired host target. The fact that a single tube could harbour all the encountering bacteria and phages together without the need to use another tube is a guarantee for the accuracy and preciseness. Furthermore, spotting onto a bacterial lawn of the host bacteria is simpler than using plaque semi-solid top layer agar assay. Using the biokinetic tests, a solid base was issued in designing accurately the future phage-based bacterial diagnostic tools which should be congruous with the lytic cycle of the phages implemented.

Hence, the protocol described herein for measuring precisely the phage biokinetics in simple single test tube could act as the template procedure for all redesigned phages.

The results of the different phases of the vertical breeding were very encouraging. It has been shown that the increments of plaques size after the breeding, along with clearer plaques, was about 2.5 mm increase for the

reference strains, 1.82 mm increase for the non-EHEC clinical isolates, and 1.9 mm increase for the EHEC clinical isolates ( $P<0.01$ ). The post-vertical breeding increase of IR, about 11%-12%, was found in the reference strains, non-EHEC isolates, and EHEC isolates ( $P<0.01$ ). The post-vertical breeding increase of BS in both reference strains and the non-EHEC isolates was about 112-114 ( $P<0.01$ ), while the post-vertical breeding increase of BS in EHEC isolates was lower, about 75, but still significant increase ( $P<0.01$ ). These results have proved definitely that the plaque-based and biokinetic-based approaches of phage vertical breeding are highly successful in deploying effective phage against *E. coli* bacteria or against any other target bacteria. The optimized phages showed remarkably higher potentials of bacterial infectivity, better host specificity, more aggressive lytic kinetics, and higher replicative standards.

It was shown that all tested phages after vertical breeding were of good burst size 73-336 with an optimal phage binding time of less than 10 minutes. The burst time was universally around 25-40 minutes and the range of IR was 74% to 98%. The biokinetic values of the burst time (BT) and the optimal phage binding time (PBT) showed no remarkable differences before and after breeding, only the burst size (BS) and the infective ratio (IR) did. This might be difficult to be explained but it was conceived that BT and PBT might be associated more with the T-family phage classification rather than to the phage optimization. Accordingly, IR, which reflects principally the specificity and the affinity of the attacking phages to their host cells, has reflected a good parameter for the post-vertical breeding optimization level. Alike, BS showed a similar good response to the optimizing techniques pursued. This might be attributed to the optimization of the recognition/specificity of the attacking phages to their host cells which leads to more stably bind phages to the host in a way that multiple phages can get inside a single host cell and amplify more effectively, or attributed to the activation of some early enzymes (EA) of the attacking phages which lead to higher replicative phage cycle.

Whilst, vertical breeding relied mainly on the accumulative bias in the selection of the minutely larger plaques of hunting the clones of phages

underwent some kind of beneficial somatic changes. These somatic changes are thought to be driven by certain mutations which are probably single base mutations in the genes encoding for tail fibre recognition sites, genes of lysozyme excretion, or genes of early phase enzymes which deploy the host metabolism for the phage tactics.

A significant positive correlation coefficient was found among the post-breeding increment values of high infective ratios (IR), high post-breeding burst size (BS), and plaque size of the tested phages which gave a clue on the comprehensive nature of the invented optimization techniques. This serves well for formulating a huge mixture of potentially optimized phages against many of *E. coli* strains or any other bacteria, for preparing the basis of successful horizontal breeding which requires high number of optimized starter phages to give new specificities, and for establishing a background of successful phage rapid diagnostic and phage therapeutic trials.

The IR, BS, the relatively short burst time (BT), and the highly optimized lytic characteristics (larger and much clearer plaques) are the most important parameters for selecting the best phages for designing the diagnostic, therapeutic, biocontrol and bioprocess protocols. Most of designed phages were capable of amplification by 3 logs every 25-40 min, with an average of 30 minutes. Thus it will be the pillar trait of getting high yield phage progenies in which fast and precise diagnostic tests could be attainable using many detection techniques like ATP release, fluorescent dyes, immunological assays etc.

#### *Horizontal breeding*

The modifications and optimizations resulted from both the vertical and the horizontal breeding are necessary to make up a master phage cocktail that will serve as a template for any given bacteria and at any given geographical region. Upon request, the master phage mixture can be adjusted further to convert phage-negative host cell to positive for lytic phage via horizontal breeding. It's well known that not all bacterial strains are straightforwardly subject to lysis by lytic phages (Kudva et al., 1999). However, the master phage mixture of 20

vertically bred phages were undergone horizontal breeding using three simultaneous techniques; Tris-EDTA, Tris-EDTA-lysozyme and Tris-EDTA-Nisin-Tween. The 20 master phage mixture showed a total success rate of 93.3% (Table 4) by using the 3 techniques simultaneously (50%, 43.3%, and 23.3% for Tris-EDTA-lysozyme, Tris-EDTA-Nisin-Tween, and Tris-EDTA, respectively). Nevertheless, it was found that target bacterial strains and isolates respond differently to each technique which gives a clue that each technique exerts different mechanism of breeding.

The exact mechanism for acquiring new host specificities is still unknown. It is thought that, exposing hidden phage-specific receptors on the host cell, modifying the 3-dimensional configuration of these receptors, or facilitating the entry of the nucleic acid of the phages through brittle cell wall, all lead to the artificially driven intracellular replication of the phages. It is highly probable that a genetic interaction takes place between the naturally non-specific phages and some genetic elements inside the host cell.

EDTA alone, or supplemented with lysozyme or Nisin A, acts as a chelating agent on the bacterial cell wall which can lead to higher membrane permeability, more brittle cell wall or even tiny holes/tears in the outer membrane and cell wall of the target *E. coli*. This enables the non-specific phages to cross the cell wall and contact the partially-torn peptidoglycan layer.

Bacteriophages usually need 3 tail fibres and more to clip to certain receptors on the cell wall of bacteria in order to start end plate attachment in a stable way and then start phage DNA injection into the host bacteria (Weber et al., 2000). Hence, the outer membrane of EDTA-treated bacteria might become highly permeable and perceptible for phage tail fibres that responsible for the recognition of the host bacteria. Moreover, the configuration of LPS and teichoic acids might be changed, some of the hidden moieties might be exposed which all might have facilitated the clipping of phages into EDTA-treated bacteria leading to abnormally occurring lytic cycle.

Nevertheless, the exact phage infection mechanism is still unknown (Letellier, et al. 2004), but it is believed that LPS-degrading phage enzymes

facilitate the penetration of phages and such enzymes have been found as structural elements in Gram negative bacteria phages (Baxa et al., 1996; Steinbacher et al., 1997). Thus the key for successful horizontal phage breeding is modifying the bacterial cell wall using for example chemical treatment of the Examples providing phage access to the interior of the host. Inside the host cell, new information can be obtained from the remnants of current or previous phages (mainly lysogenic) that have infected the target strain of bacteria. In other words, the new phage can obtain new specificity information from other phage genes residing in the chromosomal or plasmid genomic material of the host bacteria. Most *Enterobacteraceae*, including *E. coli*, are susceptible to hundreds of lytic or lysogenic phages.. Therefore, it is rare to find an isolate of *E. coli* which has not undergone lysogenic phage infections leaving resident prophage(s) dormant inside the cell. These prophages behave as excellent genetic transfer molecules and can change the phenotypic traits of the host cells. The source of these phenotypic changes can be through prophage-encoded toxins, bacterial cell surface alterations, or resistance to the human immune system. Further, prophage integration into the host genome can inactivate or alter the expression of host genes. These resident lysogenic phages are specific phages able to infect this particular strain, but they are unable to conduct a lytic infection due to the lack of lytic cycle genes or what is recently called the “bacteriophage resistome” (Hoskisson and Smith, 2007) including crispr-associated (Cas)-clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR), which comprises clusters of repetitive DNA (CRISPR) that is associated with up to six core cas genes (Edward and Ivana, 2007) whereas, cas-CRISPR implicates in providing a mechanism for integration of bacteriophage DNA fragments into chromosomal sites to promote resistance to future infection: a form of acquired immunity (Barrangou et al., 2007). These defence mechanisms have a profound effect on host range and therefore on the use of phage as biocontrol, bioprocess and therapeutic agents. Hence, this phage design protocol might overcome the defence mechanisms by designing highly specific lytic phages for a particular resistant bacterial strain by using the combined vertical and horizontal breeding

to gain the recognition genes which reside inside the host without losing lytic genes of the bred phages. Consequently, it is proposed that phages that were forced or facilitated to insert inside bacterial cells will acquire new specificity genes from the non-lytic resident temperate phages present inside the bacterial host, and at the same time not lose their lytic genes.

However, it was thought that not all phages in the breeding solution could recognize successfully the newly modified host cells. Moreover after succeeding to get inside the host cell, not all of them could do successful intracellular interaction which is necessary to gain the particular specificity to that host cell. Therefore for highly particular resistant strains "highly phage-negative cultures *E. coli*", it was found that higher phage number in the phage master mix leads to higher success rate of the phage infection.

Repetitive cycles of horizontal breeding techniques lead to a phage population with an entirely altered host affinity. The post-breeding phage progenies do not show a distribution of attachment and virulence equivalent to the original population but instead the entire population developed new potential of recognition, attachment and infectivity against the target host cells. It is noted that the post-breeding phage progenies have not been considered successful new phages until they succeeded 100% infective activity on the target negative host culture. This ensures that the post-breeding phage progenies have gained new genetically transferred traits that make them able to recognize and lyse physiologically normal target host cells.

The phage master mix can be produced in any geographical region and is aimed at being sufficient to cover almost all pathogenic *E. coli* in that region. For example the phages isolated and designed on bacterial isolates from Asia are almost of the same importance as bacteria present in Africa or Europe. Nevertheless, it is postulated that the *E. coli* phage master mix will be the background of any further refinement suitable for any country, continent or geographical region.

One of the important points of phage breeding programmes is to avoid the development of bacterial resistance towards infective lytic phages. This

resistance is considered as the most significant adverse effect of using phages in biocontrol/therapy and in phage-based diagnostics (Merril et al., 1996). One current application of the phage hunting and phage breeding techniques is the production of a reliable phage cocktail able to cover almost all pathogenic *E. coli* strains, each bacterial strain being recognized by more than one specific designed lytic phage. In this way, if one strain developed resistance to one specific phage in the cocktail, the other phage will compensate the deficit and subdue the resistance development at its very initial stage. This is the same principle as multi-drug therapy towards serious infectious agents such as in bacterial septicaemia.

#### *Phage therapy for the multiple drug resistant bacteria (MDRB)*

Phage therapy is simply another form of biological control—the use of one organism to suppress another; and like other biological controls, the application of phage therapy holds a potential to reduce the usage of anti-pest chemicals, which in the case of phages means a reduction in the application of chemical antibiotics. One of the most hindering setbacks of using phages in bacterial therapy has been the development of resistance as described above and the difficulty of finding the suitable alternative phages timely. However, there is now an upsurge of using phages again for therapy (Sulakvelidze et al., 2001), which is on the contrary of antibiotics its arsenal is imperishable, because of the appearance of life-threatening bacterial infections by MDRB like Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Mycobacterium tuberculosis*. Therefore, the exploitation of bacteriophages as a realistic approach to the control of pathogens has attracted considerable interest in recent years (Sulakvelidze et al., 2001). Therefore, the key solution to succeed in all mentioned above phage-based applications is to formulate a cocktail of highly specific phages that are able to cover a wide range of pathogenic MDRB strains such as EHEC and non-EHEC *E. coli* strains without producing remarkable bacterial resistance. According to the protocols and art used in the current

invention, isolation of new 3-5 wild phages with full series of vertical optimization steps, plaque-based or biokinetic-based, does not take more than 2 weeks.

*Phage biocontrol, bioprocessing and animal feed for pathogenic *E. coli**

Despite the fact that a vast amount of work has been carried out on all aspects of *E. coli* since it was first described, the organism continues to provide new challenges to food safety. Although, in many countries including UK and USA, *E. coli* O157:H7 is currently the most predominant foodborne VTEC, it is not the only VTEC associated with foodborne illness: *E. coli* O26, O103, O111, O118 and O145 and other VTEC are causing significant morbidity in many countries and such serogroups are increasingly being recognized as posing an equal or possibly greater threat to human health than *E. coli* O157 (Bell and Kyriakids, 2002). Therefore, the design of this project was to create a reliable comprehensive phage cocktail which is highly capable for killing almost all serious pathogenic *E. coli* including *E. coli* serotype O157:H7. Given that, the previous efforts to contain *E. coli* spread was mistakenly focusing on only serotype O157 *E. coli* strains. This has lead to un-expected emergence of deadly epidemics by EPEC and ETEC and the discovered lately non-O157 EHEC strains.

It is the first time that such non-genetic breeding techniques are invented. Phage breeding was applied on *E. coli* which is Gram-negative bacteria that till now no satisfactory lysin extraction was succeeded. This imposes the importance of phage breeding along with phage hunting and phage optimization as the salvage for the historical setbacks of phage- therapy, bioprocessing, and biocontrol against pathogenic *E. coli*. On the other hand, the possibility for succeeding in separating phage lysins specific for *E. coli* now became closer because of the accessibility to much higher number of isolated and bred phages. Promising aspects of applying phage breeding techniques into other bacterial species became now possible especially for the multiple drug resistant (MDR) bacteria which are also resistant to phages lysis like Methicillin-resistant

*Staphylococcus aureus* (MRSA), *Mycobacterium tuberculosis* and some strains of *Salmonella*.

Phage breeding could act as a non-perishable source of new lytic phages for *E. coli*, or any other bacterial species, therefore a new era of phage therapy, biocontrol and bioprocessing will start.

The bred phages via vertical or horizontal breeding techniques could be used effectively to treat one of the most money-consuming and health-endangering problems in the food and pharmaceutical and water industries, which is the bacterial biofilms including *E. coli* biofilms.

As most of the previously implemented phage-based diagnostic assays for bacteria were lacking the sufficient coverage of almost all strains of the targeted bacteria like *E. coli*, the current invention of phage design (hunting and breeding techniques) is being the solution. One of the great applications desired for the current invention is to formulate, for the first time, a highly reliable phage-based rapid diagnostic assay for detecting almost all pathogenic strains of *E. coli* including O157 *E. coli* serotypes in simple, sensitive, inexpensive and specific manner.

*Possibility of using the current invention (as a principle) with other medically important bacteria*

According to the current invention, it is possible to invest the breakthrough in the phage design for acquiring novel bred lytic phages against some of the most endangering MDR bacteria for example, but not limited to, MRSA, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Mycobacterium tuberculosis*. The resulted phage master mix for each of the above listed dangerous bacteria will be able to be used in phage bio-processing, bio-control or fogging in hospitals and within the medical community, in the environment or in livestock (in case of MRSA) or even as topical phage therapy for MRSA or cutaneous *Mycobacterium tuberculosis*.

It is possible to create a phage master mix for other food-borne pathogens like *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, or to be used in food

processing, or as preservatives or additives in food and beverages, or for water-borne pathogens such as *Vibrio cholerae*.

It could be used to manufacture phage-based rapid diagnostic tests for other bacteria rather than *E. coli*.

It could be used in preventing and/or treating biofilms formation on urinary catheters in hospital patients caused by other bacteria like *Klebsiella*, *Proteus* or *Pseudomonas* etc.

It could be used in the treatment of peptic ulcer and gastric/colorectal cancer inducing bacteria, namely *Helicobacter pylori* which is difficult to be eradicated by antibiotics. In this condition, it is needed to test the ability of phages to endure the low pH of the stomach or can be added with alkali base like sodium bicarbonate.

The phage master mix could be used to treat the "in side the body" bacterial biofilms, namely the bacterial adhesion and growth on the prosthetic components inside the body like heart valves, prosthetic joints etc. However, the main setback here is the development of immune reaction against the introduced phages.

## References

- Ackermann, H. W., and M. S. Dubow. 1987. Viruses of prokaryotes, vol. II. Natural groups of bacteriophages. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- Ahmed, R., Bopp, C., Borczyk, A. and Kasatiya, S. 1987. Phage-typing scheme for *Escherichia coli* O157:H7. *J. Infect. Dis.* 155, 806-809.
- Alisky, J., Iczkowski, K., Rapoport, A., and Troitsky, N. 1998. Bacteriophages show promise as antimicrobial agents. *J. Infect.* 36:5–15.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. 1991. Growing lambda-derived vectors. In Current Protocols in Molecular Biology, Vol 1 ed. Asdf, A. pp. 12.1–12.3. New York: Wiley Interscience.
- Barrangou, R, Fremaux, C, Deveau, H, Richards, M, Boyaval, P, Moineau, S, Romero, DA and Horvath, P. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315: 1709 – 1712.
- Barrow, P. A., and Soothill, J. S. 1997. Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. *Trends Genet.* 5:268–271.
- Barrow P, Lovell, M and Berchieri, A., Jr.1998. Use of Lytic Bacteriophage for Control of Experimental *Escherichia coli* Septicemia and Meningitis in Chickens and Calves. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 5: 294-298.
- Baxa, U.; Steinbacher, S.; Miller, S.; Weintraub, A.; Huber, R. and Seckler, R. 1996. Interactions of phage P22 tails with their cellular receptor, *Salmonella* O-antigen polysaccharide. *Bioph. J.*, 71:2040-2048.
- Bell, C., Kyriakids, A. 2002. Pathogenic Eshcerichia coli. In: Clive de W. Blackburn and Peter J. McClure (Eds.), Food borne pathogens Hazards, risk analysis and control. Woodhead publishing, England, pp 279-306.
- Biswas, B., S. Adhya, P. Washart, B. Paul, A. N. Trostel, B. Powell, R. Carlton, and C. R. Merril. 2002. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect. Immun.* 70:204–210.

- Bohannan, B. J. M., and R. E. Lenski. 1997. Effect of resource enrichment on a chemostat community of bacteria and bacteriophage. *Ecology* 78:2303–2315.
- Brock, T.D. 1990. The emergence of bacterial genetics. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY.
- Calendar, R. (ed.). 1988. The bacteriophages, vol. 1. Plenum Press, New York, N.Y.
- Carlton, R. M. 1999. Phage therapy: past history and future prospects. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 47:267–274.
- Duenas, M and Borrebaeck, CAK. 1995. Novel helper phage design: intergenic region affects the assembly of bacteriophages and the size of antibody libraries. *FEMS microbiology letters*. 125: 317-321.
- Edward, B and Ivana, I-B. 2007. Phenotypic effects of inactivating Cas-CRISPR genes in *E. coli*. In: Molecular genetics of bacteria and phages / Turnbough, Chuck ; Dunny, Gary ; Ades, Sarah (ed). - Madison, Wisconsin, SAD: University of Wisconsin-Madison.
- Garber, L., Wells, S., and Shroeder-tucker, L. 1999. Factors associated with the faecal shedding of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on dairy farms. *Journal of Food Protection*. 62:307–12.
- Goodridge, L., Chen, J and Griffiths. MW. 1999. Development and characterization of a fluorescent-bacteriophage assay for detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1397–1404
- Goodridge, L., Gallaccio, A. and Griffiths. MW. 2003. Morphological, host range, and genetic characterization of two coliphages. *Applied and Environmental Microbiology* 69:5364–5371
- Heller, K. J. 1992. Molecular interaction between bacteriophage and the gram-negative cell envelope. *Arch. Microbiol.* 158:235–248.
- Hoskisson, PA and Smith, MCM. 2007. Hypervariation and phase variation in the bacteriophage ‘resistome’. *Current Opinion in Microbiology* 10: 396-400.

- Jackson, S. G., Goodbrand, R. B., and Johnson, R. P. 1998. *Escherichia coli* O157:H7 diarrhoea associated with well water and infected cattle on an Ontario farm. *Epidemiology and Infection*. 120: 17–20.
- Jassim, S.A.A., Stewart, G.S.A.B. and Denyer, S.P. 1995. Selective virus culture. WO9523848A1.
- Jassim, S A., A., Hibma, A.M. and Griffiths, M.W. 2005. The attachment efficiency of cell-walled and L-forms of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 3: 92-95.
- Kudva, IT., Jelacic , S., Tarr, PI., Youderian , P. and Hovde, CJ. 1999. Biocontrol of *Escherichia coli* O157 with O157-Specific Bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3767–3773.
- Lenski, R. E., and B. R. Levin. 1985. Constraints on the coevolution of bacteria and virulent phage: a model, some experiments, and predictions for natural communities. *Am. Nat.* 125:585–602.
- Letellier, L; Boulanger, P; Plançon, L; Jacquot, P; and Santamaria, M. 2004. Main features on tailed phage, host recognition and DNA uptake. *Frontiers in Bioscience* 9:1228-1339
- Levin, B. R., F. M. Stewart, and L. Chao. 1977. Resource-limited growth, competition, and predation: a model and experimental studies with bacteria and bacteriophage. *Am. Nat.* 111:3–24.
- Loretta, L. 1965. A noncspecific increase in permeability in *Escherichia coli* produced by EDTA. *Journal of Microbiology*. 53: 745-752.
- Merril, CR, Scholl, D, Adhya, SL. 2003. The prospect for Bacteriophage therapy in Western medicine. *Nat Rev Drug Discov*;2:489-497.
- Merril, C, Biswis, B, Carlton, R, et al. 1996. Long-circulating bacteriophages as antibacterial agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:3188-3192.
- Milne, L., Plom, M. A., and Strudley, I. 1999. *Escherichia coli* O157 incident associated with a farm open to members of the general public. *Communicable Disease and Public Health*. 2: 22–6.

- Mizoguchi, K., M. Morita, C. Y. Fischer, M. Yoichi, Y. Tanji, and H. Unno. 2003. Coevolution of bacteriophage PP01 and *Escherichia coli* O157:H7 in continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 170-176.
- Morita, M., Y. Tanji, K. Mizoguchi, T. Akitsu, N. Kijima, and H. Unno. 2002. Characterization of a virulent bacteriophage specific for *Escherichia coli* O157:H7 and analysis of its cellular receptor and two tail fibre genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 211:77-83.
- O'Sullivan, D., Coffey, A., Fitzgerald, GF., Hill, C., and Ross, RP. 1998. Design of a phage-insensitive lactococcal dairy starter via sequential transfer of naturally occurring conjugative pPlasmids. *Appl Environ Microbiol.* 64: 4618-4622.
- Pelczar, M.J., Chan, E.C.S., Krieg, N.R., Edwards, D.D. and Pelczar, M.F. 1993. Viruses: Morphology, classification, replication. In *Microbiology concepts and applications*. Part VII, Chapter 15, pp. 401-435. McGraw-Hill, INC. New York.
- Rieder, E., Berinstein, A., Baxt, B., Kangt, A and Mason, P.W. 1996. Propagation of an attenuated virus by design: Engineering a novel receptor for a noninfectious foot-and-mouth disease virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 10428-10433.
- Ronner, A.B. and Cliver, D.O. 1990. Isolation and characterization of a coliphage specific for *Escherichia coli* O157:H7. *J. Food Protect.* 53, 944-947.
- Schade, SZ., Adler, J. and Ris H. 1967. How bacteriophage chi attacks motile bacteria. *J Virol* 1: 599-609.
- Steinbacher S, Miller S, Baxa U, Budisa N, Weintraub A, Seckler R and Huber R. 1997. Phage P22 tailspike protein: crystal structure of the head-binding domain at 2.3 Å, fully refined structure of the endorhamnosidase at 1.56 Å resolution, and the molecular basis of O-antigen recognition and cleavage. *J Mol Biol.* 267:865-880.
- Stewart, G.S.A.B., Jassim, S.A.A., Denyer, S.P., Newby, P., Linley, K. and Dhir, V.K. 1998. The specific and sensitive detection of bacterial pathogens within 4 h using bacteriophage amplification. *J Appl Bacteriol* 84: 777-783.

- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., and Morris, J. G. Jr. 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:649–659.
- Tanji, Y., Shimada, T., Fukudomi, H., Miyanaga, K., Nakai, Y., Unno, H. 2005. Therapeutic use of phage cocktail for controlling Escherichia coli O157:H7 in gastrointestinal tract of mice. *J Biosci Bioeng.* 100:280-287.
- Vieu J. F. 1975. Les Bacteriophages. In Fabre J. (ed.): *Fraite de Therapeutique*, Vol. Serums et Vaccins. Flammarion, Paris, 337–400.
- Weber-Dabrowska, B., Mulczyk, M., Gorski, A. 2000. Bacteriophage therapy of bacterial infections: an update of our institute's experience. *Arch Immunol Ther Exp.* 48:547-551.

CLAIMS

1. A method of modifying phage-host specificity, the method comprising incubating phages in a medium comprising of one or more of a chelating agent, detergent/surfactant, enzyme, lantibiotic, antibiotics and an agent which destroys cell walls.
2. A method according to claim 1, in which the medium comprises one or more of EDTA, lysozyme, Nisin A and Tween<sup>®</sup> 20.
3. A method according to claim 1 or claim 2, in which the medium comprises all of EDTA, lysozyme, Nisin A and Tween<sup>®</sup> 20.
4. A method according to any one of claims 1 to 3 in which the phage specificity is modified to infect previously resistant strains of the same bacteria.
5. A method according to any one of claims 1 to 3 in which the phage specificity is modified to infect different strains of bacteria.
6. A method according to any one of claims 1 to 3 in which the phage specificity is modified to infect a different species of bacteria.
7. A method according to any one of the preceding claims, the method comprising the steps of:-
  - (a) obtaining large amounts of wild-type phages from at least one natural source by incubating the phages with bacterial hosts to obtain large numbers of phages,
  - (b) removing bacterial host cells, to obtain a suspension of phages,
  - (c) plating the suspension of phages from step (b) on a lawn of bacterial host cells,

- (d) assessing phage plaques to identify areas of highest phage activity,
  - (e) isolating the areas of highest phage activity and isolating phages therefrom,
  - (f) culturing the phages isolated in step (e) together with their host bacteria,
  - (g) adding a viricidal mixture to the culture media of step (f) to remove free phages from the culture medium,
  - (h) plating the viricidally-treated culture medium from step (g) onto a host bacterial lawn and identify plaques,
  - (i) removing the plaques showing most virulent phage activity from the plate and isolate the phages therefrom,
  - (j) incubating the phages obtained in step (i) in a medium comprising of one or more of a chelating agent, detergent/surfactant, enzyme, lantibiotic, antibiotics and an agent which destroys cell walls,
  - (k) isolating the bacteriophages of step (j) and incubating them in a growth medium,
  - (l) assessing the infectivity of the bacteriophages of step (k) and culturing those whose specificity has been modified,
  - (m) storing the bacteriophages cultured in step (l).
8. A method according to claim 7, in which the bacteriophages are obtained from one or more of animal or bird faeces, animal or bird litter, sewage, soil, or farmyard slurry.
9. A method according to claim 7 or claim 8, in which the bacteriophages are obtained from one or a mixture of camel faeces, quellae litters, pigeons litters, chicken litters, sheep faeces, goat faeces, cattle faeces, cattle manure, cattle farms sewage and farm soil.
10. A method according to any one of the preceding claims, in which the bacteriophages are specific for one or more of *Escherichia coli*,

*Enterbacteriacea spp., Salmonella typhimurium, Pseudomonas aeruginosa, Bacteroides gingivalis, Actinobacillus actinomycetescomitans, Klebsiella pneumoniae, Gram positive bacteria, Staphylococcus aureus, MRSA, Streptococcus mutans, Listeria monocytogenes, Streptococcus agalactiae, Coryneform bacteria, Mycobacterium tuberculosis, Salmonella spp., Campylobacter jejuni, water-borne Vibrio cholerae, or Helicobacter pylori.*

11. A method according to claim 10, in which the bacteriophage infect one or more of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Mycobacterium smegmatis*.
12. A method according to any one of the preceding claims in which steps (a) to (e) or steps (f) to (i) or both are repeated.
13. A method according to any one of the preceding claims in which steps (b) to (e) are carried out more than once.
14. A method according to any one of the preceding claims in which steps (b) to (e) are carried out in the same reaction vessel.
15. A method according to any one of the preceding claims in which step (d) further comprises the steps of assessing the biokinetics of the phage by
  - (i) taking a sample of phage from step (c) and adding it to a bacterial culture,
  - (ii) incubating the phage and bacteria together,
  - (iii) exposing the mixture of phage and bacteria to a viricidal agent, in the incubation vessel,
  - (iv) adding a surfactant the mixture in the incubation vessel and further incubating it, and

- (v) adding culture broth to the incubation vessel and incubating prior to plating on a bacterial lawn and assessment of plaque morphology.
16. A method according to claim 15, in which a serial dilution is performed prior to plating.
  17. A method according to claim 15 or claim 16, in which the phage and the bacteria are co-incubated prior to the addition of the viricidal agent for a period less than an hour.
  18. A method according to claim 15 or claim 16, in which the phage and the bacteria are co-incubated prior to the addition of the viricidal agent for a period of up to 20 minutes.
  19. A method according to claim 15 or claim 16, in which the phage and the bacteria are co-incubated prior to the addition of the viricidal agent for a period of time of between 2 and 20 minutes.
  20. A method according to any one of claims 7 to 19 in which the viricide comprises pomegranate rind extract, iron salts and a detergent or surfactant.
  21. A method according to any one of claims 7 to 20 in which the iron salt is ferrous sulphate ( $\text{FeSO}_4$ ).
  22. A method according to any one of claims 7 to 21 in which the detergent/surfactant is a polysorbate surfactant.
  23. A method according to claim 22 in which the polysorbate surfactant is Tween<sup>®</sup>20.

24. A method according to any one of claims 20 to 23 in which the pomegranate rind extract is present at a concentration of between 3.25 and 7.5%, the ferrous sulphate at a concentration of between 0.01 and 0.04%, and the Tween<sup>®</sup> 20 at a concentration of between 0.1 and 10%.
25. A method according to any one of claims 20 to 23 in which the viricidal agent is composed of 3.25 % pomegranate rind extract and 0.01 % ferrous sulphate whilst the detergent/surfactant is at 1.6% Tween<sup>®</sup> 20.
26. A method according to any one of claims 7 to 25 in which step (h) is carried out in the same medium as steps (a) to (f).
27. A method according to any one of claims 15 to 26 in which steps (i) to (v) are carried out in the same incubation vessel.
28. A method according to any one of claims 15 to 27 in which the exposure to viricide is less than an hour.
29. A method according to any one of claims 15 to 27 in which the exposure to viricide is for up to 10 minutes.
30. A method according to any one of claims 15 to 29 in which the exposure to surfactant is for less than a minute.
31. A method according to any one of claims 15 to 29 in which the exposure to surfactant is for up to 10 seconds.
32. A method according to any one of the preceding claims in which the phages obtained are further cultured and stored.

33. A phage produced by a method according to any one of the preceding claims.
34. Use of a phage according to claim 33.
35. Use of a phage according to claim 33 in a preparation for use in biocontrol for pathogenic *E. coli* in livestock, bioprocessing of machinery and tools, preservatives or additives in food or beverages, prevention of biofilm formation on medical or surgical devices including surgical implants, in phage-based rapid diagnostic testing, or in phage therapy for infection.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/GB2009/051641

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C12N7/00 A61K35/76		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <b>C12N A61K</b>		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) <b>EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, WPI Data</b>		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95/23848 A1 (AMERSHAM INT PLC) 8 September 1995 (1995-09-08) cited in the application the whole document ----- MERRIL C R ET AL: "LONG-CIRCULATING BACTERIOPHAGE AS ANTIBACTERIAL AGENTS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol. 93, no. 8, 16 April 1996 (1996-04-16) , pages 3188-3192, XP002044135 ISSN: 0027-8424 the whole document ----- -/-	1,32-34  33-35
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  <b>25 February 2010</b>		Date of mailing of the international search report  <b>05/03/2010</b>
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  <b>Mandl, Birgit</b>

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/GB2009/051641

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/097115 A1 (INST IMMUNOLOGII I TERAPII DOS [PL]; LIPINSKI TOMASZ [PL]; GAMIAN ANDR) 14 August 2008 (2008-08-14) the whole document -----	33-35
X	MERRIL CARL R ET AL: "The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine." NATURE REVIEWS. DRUG DISCOVERY , vol. 2, no. 6, June 2003 (2003-06), pages 489-497, XP002568877 ISSN: 1474-1776 the whole document -----	33-35
X	US 2002/090356 A1 (WADDELL THOMAS E ET AL) 11 July 2002 (2002-07-11) the whole document -----	33-35
A	STEWART G S A B ET AL: "THE SPECIFIC AND SENSITIVE DETECTION OF BACTERIAL PATHOGENS WITHIN 4 H USING BACTERIOPHAGE AMPLIFICATION" JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, vol. 84, 1 May 1998 (1998-05-01), pages 777-783, XP000979801 ISSN: 1364-5072 abstract page 779, left-hand column, paragraph 3 – paragraph 4 page 779, right-hand column, paragraph 2 figure 1; tables 1,2 page 781, right-hand column, last paragraph -----	1-35

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
PCT/GB2009/051641

Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 9523848	A1	08-09-1995	AU 1716295 A BR 9506962 A JP 9509831 T	18-09-1995 16-09-1997 07-10-1997
WO 2008097115	A1	14-08-2008	EP 2117568 A1	18-11-2009
US 2002090356	A1	11-07-2002	NONE	

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization

International Bureau



(43) International Publication Date  
28 February 2013 (28.02.2013)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number

WO 2013/027146 A1

(51) International Patent Classification:  
*A23K 1/00* (2006.01)      *C12N 7/00* (2006.01)  
*A61K 35/76* (2006.01)

(21) International Application Number:  
PCT/IB2012/054070

(22) International Filing Date:  
9 August 2012 (09.08.2012)

(25) Filing Language: Polish

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
PL396080      25 August 2011 (25.08.2011)      PL

(71) Applicant (for all designated States except US): PROTEON PHARMACEUTICALS S.A. [PL/PL]; ul. Tylna 3A, PL-90-364 Łódź (PL).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): DASTYCH, Jarosław [PL/PL]; ul. Tylna 3A, PL-90-364 Łódź (PL). DZIADEK, Jarosław [PL/PL]; ul. Tylna 3A, PL-90-364 Łódź (PL). FORNAL, Elżbieta [PL/PL]; ul. Tylna 3A, PL-90-364 Łódź (PL). RUMIJKOWSKA-GALEWICZ, Jarosław [PL/PL]; ul. Tylna 3A, PL-90-364 Łódź (PL). WOJTASIK, Arkadiusz [PL/PL]; ul. Tylna 3A, PL-90-364 Łódź (PL). WÓJCIK, Ewelina [PL/PL]; ul. Tylna 3A, PL-90-364 Łódź (PL).

(74) Agent: WITEK, Rafal; WTS Patent Attorneys, Witek, Śnieżko & Partners, ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław (PL).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))
- with (an) indication(s) in relation to deposited biological material furnished under Rule 13bis separately from the description (Rules 13bis.4(d)(i) and 48.2(a)(viii))



WO 2013/027146 A1

(54) Title: THE METHOD OF OBTAINING A STRAIN OF BACTERIOFAGE, SPECIFIC STRAINS OF BACTERIOPHAGE AND USE THEREOF

(57) Abstract: A method for obtaining a strain of bacteriophage specific to a selected strain of bacteria was found as well as bacteriophage strains obtained in this way. Moreover, application of bacteriophages in manufacturing of the preparation for preventing and fighting infections of farm animals, especially poultry, with pathogenic strains of bacteria sensitive to these phages was described.

## The method of obtaining a strain of bacteriophage, specific strains of bacteriophage and use thereof

This invention relates to a method for preparing a strain of bacteriophage specific to a selected strain of bacteria, bacteriophage strains obtained in this way and the application of bacteriophages to manufacture preparation for preventing and fighting infections of farm animals, especially poultry, with pathogenic strains of bacteria sensitive to these bacteriophages.

The aim of the invention is to provide production technology for an antimicrobial preparation suitable for use as a feed additive for poultry and pigs, which at the same time would be specific to pathogenic strains of *Salmonella spp* that cause incidence of salmonellosis, especially in humans. The preparation shall comply with strict safety requirements for feed additives. Prohibition to use antibiotics in animal feed, valid in European Union countries since 1<sup>st</sup> January 2006, created a huge demand for feed additives, not containing antibiotics, but having anti-microbial effect.

The aim of the present invention is to provide a preparation that could replace the currently used antibiotics.

Unexpectedly, such preparation was successfully obtained in the present invention.

This invention relates to a method of preparing a strain of bacteriophage specific to a selected strain of bacteria, characterized in that:

- a) a collection of bacteriophage strains containing a strain of bacteriophage specific to a selected strain of bacteria is obtained,
- b) culture of a selected strain of bacteria on a sterile culture medium is conducted,
- c) the culture samples are applied on the special multi-well measuring plate, then a suspension of tested bacteriophage strain at various concentrations is added and it is incubated at 37° C for at least 4 hours,
- d) resazurin is added to the culture and the incubation is continued in the dark at 37° C, for at least 3 hours,
- e) the colour or fluorescence of culture is being controlled, as well as bacteriophage strain contained in the culture that retains the blue colour or shows no significant increase in fluorescence compared with the control sample, is identified as a strain of bacteriophage specific to a selected strain of bacteria. A sterile sample that was treated with the same incubation is used as a control sample,
- f) identified strain of bacteriophage specific to a selected strain of bacteria is propagated.

Favourably, the selected bacterial strain is a strain of *S. enterica* serovar Enteritidis.

The disclosed method is suitable for an easy and rapid screening of large collections of bacteriophage and allows for easy determination of the titre (lytic strength) of tested phages, which is essential in industrial applications.

Another object of the invention is the use of bacteriophages to manufacture a preparation for preventing and fighting infections of farm animals, especially poultry, with pathogenic strains of bacteria sensitive to these bacteriophages. The manufactured preparation is intended to be administered to endangered animals with food or water, at intervals of one to seven days.

Favourably, the manufactured preparation provides at least 200-fold reduction in the level of infection a week after the administration is stopped.

Favourably, the infection to be fought is an infection of poultry with pathogenic strains of *Salmonella* sp., whereas in order to manufacture the preparation, a bacteriophage strain is selected from the group consisting of those strains disclosed in this application, deposited on 7<sup>th</sup> June 2011, in the Polish Collection of Microorganisms, under the following deposit numbers: PCM F/00069 (strain 8 sent 1748), PCM F/00070 (strain 8 sent 65) and PCM F/00071 (strain 3 sent 1), is used.

Another object of the invention is a strain of bacteriophage suitable to prevent or fight infections by pathogenic strains of *Salmonella* sp., selected from the group consisting of: PCM F/00069 (strain 8 sent 1748), PCM F/00070 (strain 8 sent 65) and PCM F/00071 (strain 3 sent 1).

The preparation according to the invention is based on natural components of the ecosystem and has no unfavourable influence on organisms other than specific pathogenic bacteria. While commercially available substitutes of antibiotics are based on substances which, like for example, organic acids, non-specifically modulate the bacterial flora, preventing to some extent the growth of undesirable microorganisms, the preparation according to the invention ensures that only pathogenic strains of *Salmonella* spp are selectively reduced. Unexpectedly, it also appeared that the preparation according to the invention is not maintained in the human or animal body, if there is no *Salmonella* spp present. In a particular realization, the preparation is suitable for use in animal production, especially to fight *Salmonella* infection in poultry.

Bacteriophage strains disclosed in this application were identified by a process according to the invention. Unexpectedly, they show a wide specificity involving the lysis of at least four specific serotypes of *Salmonella* and maintain to be stable in refrigerated storage conditions

for at least 3 months. Moreover, they can be successfully propagated on an industrial scale without loss of activity and they are not specific to the pro-biotic *Lactobacillus* bacteria.

In order to clarify the invention, it has been illustrated in the accompanying figures which present:

Figure 1: The restriction profiles for selected bacteriophages;

Figure 2: The graphs of the monitored parameters of the conducted experiments;

Figure 3: Sample image of ELISA plates immediately after adding the reaction mixture and after three hours of incubation. The OD600 optical density of the used suspension of *S. enterica* ser. Enteritidis ATCC 13076 strain amounting to 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 and 2.0, respectively corresponds to the density of cells -  $8 \times 10^5$ ,  $1.05 \times 10^6$ ,  $7.0 \times 10^6$ ,  $3.5 \times 10^7$ ,  $1.4 \times 10^8$  and  $3.8 \times 10^8$ ;

Figure 4: The results of thermal stability of selected bacteriophages carried out within three months in three different temperature conditions;

Figure 5: Results of bacteriophage preparation's cytotoxicity testing with neutral red method. A preparation containing a sterile mixture of bacteriophages was added for 24 h to culture of mouse 3T3 fibroblasts, and cell viability was assessed with the use of neutral red uptake test;

Figure 6: Detection of *Salmonella* bacilli in the experiment which was carried out;

Figure 7: The level of CFU *Salmonella* in internal organs and intestines of 21-day-old chicks. The herein description has been supplemented with the following examples which serve for better illustration of the nature of the invention. However, these examples should not be identified with the full scope of the invention.

### **Example 1. Isolation and description of bacteriophages**

*Establishing a bank of Salmonella strains (serovars) most frequently isolated from humans and farm animals*

The set of 108 *Salmonella* ssp. strains, consisting of the most frequently isolated serovars, was collected for the necessity of the project (Table 1). These strains are applied in determination of specificity of purified bacteriophages. The collection is comprised of both reference strains available in public repositories, as well as isolates obtained owing to cooperation with the VETLAB company (Brudzew, Poland) and State Sanitary Inspection.

**Table 1.** The list of *Salmonella enterica* serovars and their origins.

No.	Serovar	Number of strains	Source
1	Berta	1	VetLab
2	Brandenburg	1	State Sanitary Inspection
3	Coeln	1	VetLab
4	Colindale	1	VetLab
5	Derby	1	VetLab
6	Enteritidis	1	ATCC
		1	State Sanitary Inspection
		58	VetLab
7	Gallinarum	1	VetLab
	Pullorum		
8	Hadar	2	VetLab
		1	State Sanitary Inspection
9	Heidelberg	1	VetLab
10	Infantis	6	VetLab
		1	State Sanitary Inspection
11	Mbandaka	1	VetLab
12	Moscow	1	VetLab
13	Newport	5	VetLab
14	Paratyphi	1	ATCC
15	Senftenberg	1	VetLab
16	Typhi	1	ATCC
17	Typhimurium	1	ATCC
		1	State Sanitary Inspection
		10	VetLab
18	Virchow	9	Vetlab

*Isolation of bacteriophages, from environmental samples, showing activity towards selected serovars of reference *Salmonella* ssp strains*

Bacteriophages were isolated from samples provided by the Wastewater Treatment Plants from Lodz, Poland and Tuszyn, Poland. The studies confirmed that the samples collected from sands' separation stage (sand chamber), which is one of the wastewater's treatment processes, are the richest source of viruses. Moreover, the bacteriophages were also obtained

from hen feces, provided by a private farmer and VETLAB company specializing in bacterial contamination analysis of farms. Isolation of phages was carried out with the use of *Salmonella enterica* reference strains, including Typhimurium, Enteritidis and Typhi serovars, as well as several environmental strains. So far, several selected phages were described in details (Table 2).

**Table 2.** The list of obtained bacteriophages and their host strains.

No.	Bacteriophage	Source	Host strain
1	1st1	Wastewater treatment plant	<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium LT2
2	1sent3	Wastewater treatment plant	
3	1sent4	Wastewater treatment plant	
4	3sent1	Wastewater treatment plant	<i>S. enterica</i> ser Enteritidis ATCC 13076
5	4sent1	Private farm	
6	6sent1	Private farm	
7	5sent1	VetLab	<i>S. enterica</i> ser. Enteritidis 65/S/10
8	8sent65	VetLab	
9	8sent1748	VetLab	<i>S. enterica</i> ser. Enteritidis 1748
10	2styp4	VetLab	
11	2styp5	VetLab	<i>S. enterica</i> ser. Typhi ATCC 13311
12	6styp1	Private farm	

All phages intended for further investigations were purified with the use of the screening method in order to obtain a single plaque on the LB (Luria-Bertani) plates. This procedure required at least five time application of the screening process.

Initially, specificity of viruses isolated with the use of the plate method was defined by determining the lytic capability of isolated bacteriophages towards 17 selected *S. enterica* strains, including 7 various serovars selected, 9 strains of Enteritidis serovars isolated from humans and farming animals, as well as the host strains of analyzed bacteriophages (Table 3). In order to confirm the results, the specificity determination of isolated bacteriophages was repeated three times.

**Table 3.** Specificity of selected bacteriophages in relation to chosen reference and environmental strains.

Bacteriophage \ S. enterica serovars	Ist1	Isent3	Isent4	3sent1	4sent1	5sent1	6sent1	8sent65	8sent1748	2styp4	2styp5	6styp1
Typhimurium LT2	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+
Typhimurium 1751	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Typhi ATCC 13311	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
Paratyphi A ATCC 19150	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Infantis 789	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Brandenburg 584	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
Hadar 817	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-
Enteritidis D ATCC 13076	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Enteritidis 1748	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
Enteritidis 65/S/10	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Enteritidis 249	+	+	+	+	+	+	nd	+	+	-	-	nd
Enteritidis 1014/S/09 K-1	+	+	+	+	-	+	nd	+	+	-	-	nd
Enteritidis 1192/S/09 K-8	+	-	+	+	-	+	nd	+	-	-	-	nd
Enteritidis 1250/S/09	+	-	+	+	-	+	nd	+	+	-	-	nd
Enteritidis 1446/S/09 K-31	+	+	+	+	-	+	nd	+	+	-	-	nd
Enteritidis 1535/S/09	+	+	+	+	+	+	nd	+	+	-	-	nd
Enteritidis 2050/S/09 K-4	+	+	+	+	+	+	nd	+	+	-	-	nd

nd – not determined

The resulting phages, propagated in the host strain, were concentrated by PEG8000. Such prepared samples were subjected to the process of isolation of genomic DNA of studied bacteriophages. This procedure uses zircon spheres of 0.1 mm diameter. It also uses extraction with organic solvents and commercial systems for the isolation of genomic DNA. The resulting DNA is used in (1) restriction analysis (three independent experiments using the *Eco*RI enzyme) generating various restriction profiles for different bacteriophages, which represents an initial gene characterization of phages (Fig. 1).

A more detailed genetic characterization is obtained from sequencing the genomes of bacteriophages from our collection, performed with the use of new-generation sequencing techniques, subcontracted to the Macrogen company. Analysis of the results of such sequencing is performed by our research team. It was established that so far obtained sequences of the genomic DNA show high homology towards the bacteriophage from very well explored T5 family and are the lytic bacteriophages.

### **Example 2. Manufacture of the preparation**

#### *Determination and optimization of bacteriophage propagation process conditions in a *Salmonella* ssp. culture at a laboratory scale*

Optimization was carried out with the use of *Salmonella enterica* ser. Enteritidis ATCC 13076 strain. The parameters taken into consideration were as follows: inoculum volume of a bacterial culture and bacteriophages, time of the pure culture process and incubation of infected culture, temperature of the culture, aeration level, pH of medium and conditions required for lytic cycle induction.

The optimal inoculum volume of bacterial culture was assessed to be  $2 \times 10^9$  CFU for 0.5 l of culture medium. The optimized culture process was being carried out until optical density reached the level of  $OD_{600} = 0.5$ , which was achieved after 3 hours of incubation. The temperature of  $37^\circ\text{C}$  appeared to be the optimal for bacterial growth. The optimal aeration level was achieved by shaking at 220 rpm in the New Brunswick shaker. The optimal culture's growth was observed on the LB medium of  $pH = 7.0$ . The optimization process demonstrated that the addition of 10% of bacteriophage suspension showing titer of  $10^9$  (50 ml per 500 ml of culture) is the most favourable inoculum amount. Also, the analysis showed that the optimal initial proportion of bacteriophages particles and bacterial cells is 25:1. Moreover, the optimization studies revealed that the isolated bacteriophages display lytic nature and consequently induction of the lytic cycle is not required.

The process of bacteriophage's recovery from culture was performed by ultracentrifugation in Beckman L-80 type ultracentrifuge. Bacterial cultures infected with bacteriophages after proper incubation process (see above) were initially centrifuged for 30 min (3700 g). Afterwards, the supernatant was transferred into Beckman type ultracentrifugation tubes and ultracentrifuged for 2 hours (200 000 g). This procedure allowed for simultaneous purification and concentration of phage preparation.

#### *Optimization of *Salmonella* spp reference strain culture in 10-liters scale*

In the next step of the optimization, bacteriophage propagation method in a 10-liters bioreactor (8-liters of working volume) was developed. For this purpose, 8 litres of LB

medium was prepared and autoclaved (for 20 min. at 120°C) in the bioreactor. Before inoculation with 200 ml of *Salmonella Enteritidis* 65 strain, the medium was aerated to 90% - 100% and heated up to 37°C. The inoculum was a 16-hour bacterial culture showing optical density of approximately  $OD_{600} = 5.0$  ( $4.5-5 \times 10^9$  CFU/ml). After inoculation of the medium, sample was taken in order to measure optical density ( $OD_{600}$ ) of *Salmonella Enteritidis* 65 initial culture. The crucial parameters of the culture and the final titer of propagated bacteriophages were monitored (Table 4 and 5). The culture was carried out in bioreactor with constant aeration at 1.3 lpm (air volume delivered to the medium during 1 minute) and stirring at 50 rpm. After 40 minutes of the process, stirring intensity was increased from 50 to 100 rpm. During the culture process, samples were taken every 30 minutes for determination of optical density of the culture ( $OD_{600}$ ). When the bacterial culture's optical density ( $OD_{600}$ ) of the value of 0.48-0.55 was achieved, a 3sent1 bacteriophage suspension of suitable titer was added into the culture, in the volumes as follows:

- 800 ml in case of experiment 1,
- 700 ml in case of experiment 2, as well as
- 200 ml in case of experiment 3 and 4.

From this point of time, the culture was carried out for 4 hours with constant aeration and stirring (see above). The changes of optical density and phage propagation kinetics were monitored by taking samples every hour. During the process, culture parameters, including pH,  $pO_2$  (aeration level indicated in %), temperature of the medium and correct level of stirring, were monitored. Every monitored parameter was recorded with the use of software designed for documentation of the course of culture process (Figure 2), except experiment 1, due to technical problems experienced with initializing of the software. During the conducted experiments, progressing decrease of dissolved oxygen level in medium (increase of oxygen consumption by bacterial cells due to their growth in the culture), as well as small pH fluctuations within the range of 7.2-6.7, were noted.

Regardless of the phage suspension volume used (from 200 to 800 ml with titer of  $1.3-2.3 \times 10^9$  PFU/ml), high propagated bacteriophage titer of about  $10^9$  PFU/ml was achieved.

**Table 4.** Parameters of 3sent1 phage's propagation in 10 litres of *Salmonella Enteritidis* 65 strain culture.

	Volumes applied [ml]			
	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	Experiment 4
Bacterial inoculum	200 ml	200 ml	200 ml	200 ml
Phage suspension	800 ml	700 ml	200 ml	200 ml
OD <sub>600</sub>				
Beginning of the process	0.097	0.089	0.070	0.070
Before addition of phage suspension	0.488	0.501	0.501	0.535
1h of phage's propagation	0.589	0.720	0.856	0.477
2h of phage's propagation	0.150	0.286	0.632	0.198
3h of phage's propagation	0.110	0.210	0.372	0.160
4h of phage's propagation	0.068	0.182	0.320	0.166

**Table 5.** Number of propagated 3sent1 phage particles.

	Density of phage suspension [PFU/ml]			
	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	Experiment 4
Initial phage suspension	2.32x10 <sup>9</sup> PFU/ml	1.17x10 <sup>9</sup> PFU/ml	1.33x10 <sup>9</sup> PFU/ml	1.44x10 <sup>9</sup> PFU/ml
1h of phage's propagation	6.20x10 <sup>9</sup> PFU/ml	1.05x10 <sup>9</sup> PFU/ml	1.42x10 <sup>9</sup> PFU/ml	4.94x10 <sup>9</sup> PFU/ml
2h of phage's propagation	5.54x10 <sup>9</sup> PFU/ml	4.32x10 <sup>9</sup> PFU/ml	5.98x10 <sup>9</sup> PFU/ml	3.90x10 <sup>9</sup> PFU/ml
3h of phage's propagation	6.26x10 <sup>9</sup> PFU/ml	3.84x10 <sup>9</sup> PFU/ml	5.72x10 <sup>9</sup> PFU/ml	5.80x10 <sup>9</sup> PFU/ml
4h of phage's propagation	7.94x10 <sup>9</sup> PFU/ml	4.16x10 <sup>9</sup> PFU/ml	4.26x10 <sup>9</sup> PFU/ml	3.16x10 <sup>9</sup> PFU/ml

After 4 hours of bacteriophage propagation process, the whole content of bioreactor was centrifuged for 30 minutes at 4°C, at the speed of 4500 rpm/min. Since the technical parameters applied are not effective enough for precise separation of biomass from medium;

at the next step the supernatant containing phage particles was micro-filtrated twice with the use of the filtration cross-flow system with membrane cassettes for separation of remaining biomass and sterilization of the obtained phage preparation

**CONCLUSIONS:** The performed biotechnological processes enabled us to describe initial restrictions for phage particles propagation method using *Salmonella* spp strain culture in 10-liters bioreactor scale.

- Volume of medium – 8 litres;
- Volume of *Salmonella Enteritidis* 65 inoculum ( $OD_{600} = 5$ ;  $4.5-5 \times 10^9$  CFU/ml) – 200 ml;
- Volume of phage suspension (titer  $10^9$  PFU/ml) - 200 ml;
- Time of phage particles propagation process – 3 hours;
- Parameters of centrifugation – 30 minutes at  $4^\circ C$ , at the speed of 4500 rpm/min;
- Two-time microfiltration (membrane with pore size of  $0.22 \mu m$ );
- Titration procedure of the obtained phage preparation;

*Development of the preparation's manufacturing and purification technology*

#### Stages of bacteriophage preparation's manufacturing process

##### **1. Bioreactor culture.**

Propagation process of bacteriophage particles is the first stage of the production line. This is realized by inoculating a bacterial culture of *Salmonella* in a bioreactor (conditions described above) with bacteriophage particle suspension. During the culture process, phage particles are propagated in bacterial cells leading to cell lysis. Each of all three bacteriophages has to be propagated in a separate culture. So far in our research, a classic 10-liter bioreactor (8 litres of working volume) has been used. In order to carry out this type of culture, previously prepared components are used, including (1) bacterial inoculum and (2) bacteriophage suspension which is added after achieving a suitable optical density ( $OD_{600}$ ) of the bacterial culture. After addition of phage suspension, the culture is carried out from 3 to 4 hours and the process enables to obtain a high titer of a propagated bacteriophage at the level of about  $10^9$  PFU/ml. Once the propagation procedure is finished, the culture is transferred in a sterile manner to the next stage of production process by means of peristaltic pump. In the future, 100-liter bioreactors or single-use advanced bioreactor bags (up to 15 litres), which lately successfully replace classic bioreactors, are planned to be applied at the production line.

##### **2. Removal of biomass.**

Since the total lysis of bacterial culture during the bioreactor incubation process is not possible, a subsequent stage separation of the biomass from phage-containing culture liquid is required. Therefore, at the first stage, the culture is transferred to a centrifuge, and then microfiltration process is carried out twice using cross-flow filtration system containing membrane with pore size of 0.22 µm. This procedure allows to obtain a sterile bacteriophage suspension with very small decrease in phage particles titer. Once the filtration process is finished, the suspension is transferred in a sterile manner to the next stage of production process by means of peristaltic pump. In the future, expansion of this stage of the production line by purchasing additional filtration systems is planned. This would allow for treatment of the biological material obtained from a single bioreactor culture without the need for cleaning and sterilization of the filtration equipment used during this stage.

### **3. Product concentration (optional).**

Depending on the product demand, bacteriophage suspension can be concentrated 10-fold which allows for increase of the number of phage particles in a given volume. Therefore, a cross-flow filtration system with ultra-filtration membrane of 30 or 50 kD cut-off (depending on the phage), is used. This process allows for 7.5-fold concentration of bacteriophage particles.

### **4. Removal of potential endotoxin contamination.**

In order to eliminate endotoxin remaining after lysis of bacterial cells induced by bacteriophages during the biotechnological process, application of special adsorption columns is planned. These columns will contain resin suitable for removing endotoxin of size and capacity depending on the volume of the phage-containing preparation.

### **5. Preparation of the product in liquid phase.**

At this stage, a mixture of different bacteriophage suspensions, obtained in procedures described above, is prepared. The mixture should contain all bacteriophages with very similar titer value. Bacteriophages selected for the preparation show lysis capability of widest spectrum of *Salmonella* spp bacterial strains from the possessed collection. Subsequently, the preparation is portioned in strictly sterile conditions. Additionally, during this process the final suspension is again subjected to sterilization by means of a single-use, micro-filters (0.22 µm).

### **6. Microencapsulation (optional)**

Depending on whether the product is required in liquid or solid form, implementation of microencapsulation technology is planned in order to enclose bacteriophage particles in alginate capsules. The purpose of this stage is to generate easily absorbable capsules which

safely pass through the digestive system and to release gradually the enclosed bacteriophage particles in the target place without irritating the whole organism.

### **Example 3. Research of the effectiveness and safety of the preparation**

#### ***In vitro* research**

*Development and optimization of the highly efficient and automated colorimetric method for measurement of bacteriophage preparation activity*

The commercially available alamarBlue® reagent was used for development of the assay useful for measuring the bacteriophage lytic activity. The alamarBlue® is an indicatory dye which enables fast and accurate quantification of proliferation and cytotoxicity based on chromatic reaction. An easy-to-use reagent takes advantage of the phenomenon of a reduction-oxidation reaction (REDOX) and during the process a resazurin changes its colour from blue (non-fluorescent) to red (fluorescent) as a result of oxidation, which is a consequence of cell metabolic activity. The change of colour is visible with the naked eye. It can be also measured spectrophotometrically or fluorometrically. Due to its lack of cell toxicity, alamarBlue® is especially valuable in observation of bacterial cell differentiation in microbial cultures. This test was adjusted for application on 96-well ELISA plate and two techniques of measurement were elaborated. The first one was intended to assess the lytic activity of bacteriophages. During the test, the so called fresh working mixture was used (prepared just before application on the ELISA plate), which consisted of alamarBlue® and 20% sterile Tween™80 solution (3 parts of alamarBlue® and 1 part of 20% sterile Tween™80 solution), and was added to wells containing studied *Salmonella* strain suspension of appropriate density, as well as to wells filled with both *Salmonella* cell suspension of appropriate density and studied bacteriophage suspension of desired titer. The procedure enables visual determination of the lytic activity of phage particles in relation to the investigated *Salmonella* strains. The blue colour of the reaction mixture of alamarBlue® + 20% sterile Tween™80 solution (3 parts of alamarBlue® and 1 part of 20% sterile Tween™80 solution) indicates lack of growth of the studied *Salmonella* strain and high lytic effect of proper bacteriophage concentration. Colour change of the reaction mixture of alamarBlue® + 20% sterile Tween™80 solution (3 parts of alamarBlue® and 1 part of 20% sterile Tween™80 solution) from blue to red, caused by the oxidation associated with metabolic activity, indicates growth of *Salmonella* cells and lack or low lytic effect of proper bacteriophage concentration in relation to the investigated *Salmonella* strain.

A detailed experimental protocol enabling quantitative assessment of the lytic activity of bacteriophages, as well as a drawing presenting the results of a selected experiment conducted for the 3sent1 bacteriophage in relation to *Salmonella enterica* ser. Enteritidis ATCC 13076 strain (Figure 3), are presented below.

1. Add 100 µl of *Salmonella* spp. culture suspension of proper optical density ( $OD_{600}$ ) relating to appropriate number of colony forming units (CFU/1 ml)<sup>1</sup> into each well of the first row in columns from 1 to 12. In detail: suspension of the optical density of 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 and 2.0 into the plate wells: 1 and 7, 2 and 8, 3 and 9, 4 and 10, 5 and 11, as well as 6 and 12, respectively.
2. Add 100 µl of phage suspension at concentration of  $6.5 \times 10^9$  PFU (plaque forming units) into each well of the first row in columns from 1 to 6. The volume proportion of bacterial to phage suspension is 1:1.
3. Similarly, add 75 µl of *Salmonella* spp. culture suspension of proper optical density and 125 µl of phage suspension into wells of the second row. The volume proportion of bacterial to phage suspension is 1:1.5.
4. Similarly, add 50 µl of *Salmonella* spp. culture suspension of proper optical density and 150 µl of phage suspension into wells of the third row. The volume proportion of bacterial to phage suspension is 1:3.
5. Prepare the controls; add sterile LB medium instead of phage suspension into each well of the first, second and third row in columns from 7 to 12 (control of *Salmonella* strain growth of given densities). Additionally, add phage suspension into each well of 6<sup>th</sup>, 7<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> row in column 3 (control of phage suspension contamination) and add LB medium into each well of 7<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> row in column 7 (control of contamination of the medium applied to dilute the culture in investigated and control set).
6. Cover the ELISA plate with sterile lids and incubate for 4 h at 37°C. After the incubation stage, add 50 µl of alamarBlue® + 20% sterile Tween™80 reaction mixture<sup>2</sup> into each well plate. Due to the reaction mixture's susceptibility to light, protect the plate with aluminium foil. Continue the incubation for the next 3 h in 37°C. Perform visual observation every 30 minutes.

<sup>1</sup>Relation between the  $OD_{600}$  optical density and the CFU value should be determined experimentally in several independent approaches.

<sup>2</sup>The mixture should be prepared directly before application into wells on ELISA plate (3 parts of alamarBlue® and 1 part of 20% sterile Tween™80 solution).

The modified protocol may be applied as a useful tool for estimation of protective effect of bacteriophages against *Salmonella Enteritidis* growth. Colour change of the reaction mixture of alamarBlue® from blue to red, which is caused by the oxidation associated with metabolic activity, indicates *Salmonella* cells' growth. The blue colour of the reaction mixture of alamarBlue® + 20% sterile TweenTM80 solution indicates protective effect of phage suspension preventing growth of *Salmonella* cells. The detailed protocol:

1. Add 20 ml of LB medium to 100 ml Erlenmayer conical, flat-bottom flasks and autoclave.
2. Inoculate 20 ml of sterile LB liquid medium with *S. Enteritidis* strain and incubate the culture overnight at 37°C with shaking (rpm=150). The suspension shall be stored in refrigerator at 4°C not longer than for 1 week and treated as inoculum for current cultures.
3. Inoculate 20 ml sterile LB liquid medium (in 100 ml Erlenmayer flasks) with 20 µl of *S. Enteritidis* strain and incubate the culture for 1 h at 37°C with shaking (rpm=150).
4. Make appropriate dilutions of the suspension in LB. Dilutions should contain 2000, 200 and 20 bacterial cells in 1 ml. Use for experiments with phage suspension showing protective effect.
5. Mix 100 µl of the appropriate dilution of *S. Enteritidis* bacterial cells with 100 µl of bacteriophage suspension and add the mixtures into the sequential wells of 96-wells titer plate.
6. Prepare the controls; appropriate dilutions of *S. Enteritidis* suspension which will serve as bacterial growth control, as well as the bacteriophage suspension and a clear LB medium as the controls of microbial contamination.
7. Cover the titer plate with a lid and incubate for 4 h at 37°C.
8. Cover the titer plate with a lid and protect with aluminium foil against admission of light, then continue the incubation for next 4 h at 37°C. Perform the reading, after 4 hours of the incubation process.

#### *Research of thermal stability of bacteriophages*

Analysis of thermal stability of bacteriophages storage was carried out for 3 months at three different temperatures: -20 ° C, +4 ° C and at room temperature. The stability was measured by determining phage titer by means of plate count at the beginning of the experiment, after one month and after three months of storage in the mentioned above temperatures. Bacteriophages were suspended in LB medium after propagation and purification from

bacterial cells. The results indicate that some of bacteriophages of the existing collection, namely 3sent1, 8sent65 and 8sent1748 (Fig. 4), retain their title at the order of magnitude within three months of storage at -20 ° C or 4 ° C, contrary to other phages, e.g.: 1st1 or 2styp5 (Fig. 4), which is important in view of durability.

*Research of bacteriophage preparation's safety*

Determination of endotoxin level

Determination of endotoxin concentration (LPS), the major component of cell's wall of gram negative bacteria, was performed using LAL test (*Limulus Amebocyte Lysate*). The LAL tests are available as ready-to-use kits for colorimetric measurement of LPS level and activity:

1. Kit produced by Genscript (ToxinSensor LAL Endotoxin Assay Kit).
2. Kit produced by LONZA (QCL-1000 Endpoint chromogenic LAL Assay).

In these tests, LAL reagent interacts with endotoxin in analyzed samples resulting in production of a reaction product which is able to react with chromogenic substrate, thus the spectrophotometric measurement is possible. The intensity of the colour is directly proportional to endotoxin concentration.

Phage-containing samples were taken at different stages of the technological process (assessment of ultracentrifugation's effectiveness – A1-A2 samples, and phage particles concentration using different membranes cut-off: 100 kDa – B1-B5 samples and 50 kDa – C1-C7 samples) and analyzed for endotoxin level. The results obtained indicate presence of high amount of LPS in samples taken after the phage particles concentration stage (Table 6).

**Table 6.** Results of LPS concentration in analyzed samples.

Sample No.	Description	LPS concentration EU/ml
A1	Sample containing pellets (phages) after ultracentrifugation suspended in SM buffer	>10 <sup>6</sup>
A2	Sample containing supernatant after ultracentrifugation	106 345
B1	Initial sample – medium containing phages after separation of bacterial cells and sterilization	>10 <sup>6</sup>
B2	10-fold concentrated preparation (retentate)	156 389
B3	Permeate – liquid filtered through a concentration membrane	4 888

B4	Saline used to flush the membrane after the end of filtration process, collected as permeate	55
B5	Saline used to flush the membrane after the end of filtration process, collected as retentate	0.5
C1	Initial sample – medium containing phages after separation of bacterial cells and sterilization	211 327
C2	Permeate – liquid filtered through a concentration membrane	25
C3	10-fold concentrated preparation (retentate)	$1.36 \times 10^{10}$
C4	Saline used to flush the membrane after the end of filtration process, collected as retentate (first sample 100 ml)	$1.69 \times 10^9$
C5	Saline used to flush the membrane after the end of filtration process, collected as retentate (second sample 200 ml)	$1.32 \times 10^9$
C6	Saline used to flush the membrane after the end of filtration process, collected as retentate (third sample 200 ml)	$1.05 \times 10^8$
C7	Saline used to flush the membrane after the end of the filtration process, collected as retentate (fourth sample 500 ml)	1 549

### *Cytotoxicity analysis*

Investigation was carried out by means of the neutral red uptake assay. The test was performed with 96-wells plates using 3T3 cell line. 3T3 cells are mouse-derived, non-transformed fibroblasts conventionally used for *in vitro* toxicity analysis. Analysis was carried out on the preparation containing a mixture of three different phages in 4 serial dilutions. Measurements were performed in duplicates and in 5 independent repetitions. Obtained absorbance values were used for calculation of % of cells' viability by comparing the absorbance of analyzed sample with absorbance of control sample (i.e. cells incubated in culture medium) (Figure 5).

#### Cytotoxicity test using 3T3 cell line:

1. Put 10 000 3T3 fibroblasts suspended in standard culture medium to each well of 96-wells plate and incubate for 24 hours in the incubator (37°C; 5% CO<sub>2</sub>).
2. Remove culture medium and add bacteriophage preparation diluted in culture medium. Continue the incubation for next 24 hours (37°C; 5% CO<sub>2</sub>).
3. After the incubation, remove medium containing phage preparation, wash the monolayer of PBS fibroblasts and incubate with neutral red solution in PBS for 3 hours (37°C; 5% CO<sub>2</sub>).

4. Remove neutral red solution, wash with PBS and induce cell lysis. Measure the amount of absorbed dye by colorimetric method.

Obtained results indicate lack of cytotoxic activity of bacteriophage preparation even at high concentrations. Consequently, acute cytotoxicity is not expected to appear after using this preparation *in vivo* at phage concentration of at least up to  $10^8$  particles.

### ***In vivo* research**

*Determination of effectiveness and safety of prototype bacteriophage preparation applied against salmonellosis in chicken broilers.*

The study was carried out in cooperation with the University of Warmia and Mazury, as well as VETLAB.

**Purpose:** To evaluate the possibility of using bacteriophages in protection against salmonellosis infections in broiler chickens.

*Salmonella enterica* ser. Enteritidis 65/S/10 strain provided by VETLAB was used to infect broilers, whereas to prepare the bacteriophage agent, three bacteriophages: 3sent1, 8sent65, and 8sent1748, isolated from two *Salmonella enterica* strains (Table 3) and showing a wide spectrum of specificity against different *Salmonella* serovars, as well as against investigated Enteritidis strains, were used. Based on specificities of the used bacteriophages, specificity of the complete preparation can be assumed (Table 7). Bacteriophage preparation was prepared in the following manner: each of the three bacteriophages were subjected to the optimized procedure of propagation, and afterwards the obtained phage suspensions were mixed, so that their titer values in the final product were similar. Two mixtures with different phage concentrations were prepared: high concentration containing  $2.0 \times 10^8$  PFU/ml and low concentration containing  $2.0 \times 10^6$  PFU/ml. Afterwards, the mixtures were portioned and sterilized using microfiltration. Analysis of microbial contamination showed no presence of bacteria in the bacteriophage preparation used.

**Table 7.** Assumed specificity of the preparation based on specificity of phages included.

Serovar	Strain	3sent1	8sent1748	8sent65	PREPARATION
Typhimurium	LT2	+	+	+	+
	1751	-	+	-	
Typhi	ATCC 13311	+	+	+	+
Paratyphi	A ATCC 19150	-	+	-	
Infantis	789	-	-	-	
Brandenburg	584	+	+	+	+
Hadar	817	+	+	+	+

Enteritidis	D ATCC 13076	+	+	+	+
	1748	+	+	+	+
	65/S/10	+	+	+	+
	249	+	+	+	+
	1014/S/09 K-1	+	+	+	+
	1192/S/09 K-8	+	+	-	
	1250/S/09	+	+	+	+
	1446/S/09 K-31	+	+	+	+
	1535/S/09	+	+	+	+
	2050/S/09 K-4	+	+	+	+
	Farm "K" K-3	+	+	+	+
	Farm "K" K-6	+	+	+	+
	Farm "K" K-9	+	-	-	
	Farm "K" K-10	+	+	-	
	Farm "K" K-11	+	-	-	
	Farm "K" K-12	+	-	-	
	Farm "K" K-14	+	+	+	+
	Farm "K" K-18	-	-	-	
	Pac K-ground	-	+	+	
	Pac K-floor	+	+	+	+
	W/K-6	+	+	+	+
	W/K-7	+	+	-	
	W/K-9	+	+	+	+
	64/S/10	+	+	+	+
	65/S/10	+	+	+	+
	517/S/09	+	+	+	+
	571/S/09	+	+	+	+
	833/S/09	+	+	+	+
	838/S/09	+	-	+	
	838/S/09 B	+	+	+	+
	847/S/09	+	+	+	+
	848/S/09	+	-	-	
	865/S/09	+	+	+	+
	866/S/09	+	+	+	+
	945/S/09	+	+	+	+
	975/S/09	+	+	+	+
	1013/S/09 K-4	+	+	+	+
	1021/S/09	+	+	+	+

1022/S/09 K-9	+	+	+	+
1044/S/09 K-2	+	-	+	
1047/S/09 K-1	+	+	+	+
1048/S/09 K-8	+	+	+	+
1061/S/09 K-5	-	-	-	
1067/S/09 K-2	+	-	-	
1067/S/09 K-3	+	+	+	+
1085/S/09 MEK	+	+	+	+
1106/S/09 K-1	+	+	+	+
1143/S/09	+	+	+	+
1171/S/09	+	+	+	+
1206/S/09 MEK	+	+	+	+
1231/S/09	+	+	+	+
1250/S/09	+	+	+	+
1257/S/09 K-7	+	+	+	+
1422/S/09 MEK	+	+	+	+
1445/S/09 K-46	+	-	+	
1465/S/09 MEK	+	+	+	+
1535/S/09	+	+	+	+
1542/S/09 NWJ	+	+	+	+
1545/S/09 MEK	+	-	+	
1572/S/09 NWJ	+	+	+	+
1573/S/09 NWJ	+	+	+	+
1714/09	+	+	+	+
1748	+	+	+	+
2149/09	+	+	+	+
2619/S/10	+	+	+	+

#### *Experimental procedure*

One hundred fifty Ross 308 roosters, divided randomly into 5 equal, isolated groups (separate rooms – boxes), were used for the research. Chickens were fed with standard, complete feed produced by Agrocentrum Kolno, Poland and kept in conditions complying with recommendation of the biological material's manufacturer. Four-days-old chickens from boxes 1, 2 and 3 were infected with *Salmonella Enteritidis* bacilli in a dose of  $1 \times 10^5$  CFU per animal (Table 8). Chickens from boxes 4 and 5 were not infected with *Salmonella* bacilli. The bacteriophage preparation was administered to chickens placed in boxes 1 (low concentration of  $2.0 \times 10^6$  PFU/ml, marked as F<sub>N</sub>), 2 and 5 (high concentration of  $2.0 \times 10^8$  PFU/ml, marked as F<sub>w</sub>). The preparation was administered to roosters once a day for first 14

days of their lives. The bacteriophage agent was not administered to chickens from boxes 4 and 5. The rearing time was 21 days and during this period only five birds from different boxes died (Table 8). Since the detected death rate was minimal and did not depend on a given group of chickens therefore the death rate could not have been the result of the administration of the phage preparation.

**Table 8.** The scheme of administration of bacteria and bacteriophages, as well as birds' viability.

Box	Salmonella infection	Bacteriophage administration	Chicken's viability
1	$1 \times 10^5$ CFU/bird	$2.0 \times 10^6$ PFU/ml	30/30
2	$1 \times 10^5$ CFU/bird	$2.0 \times 10^8$ PFU/ml	29/30
3	$1 \times 10^5$ CFU/bird	-	28/30
4	-	-	30/30
5	-	$2.0 \times 10^8$ PFU/ml	28/30

#### Detection of *Salmonella* bacilli

Samples for *Salmonella* bacilli detection were collected according to the scheme described below (Figure 6):

- Investigation of feces during 21 days of experiment,
- Investigation of litter – sole smears were collected on 3<sup>rd</sup>, 15<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> day of birds' life,
- Investigation of liver, spleen and intestines of 21-days-old broilers,
- Investigation of empty boxes before insertion of nestlings – smears were collected from walls, feeders, drinkers and floor (control),
- Investigation of one-day-old nestlings – internal organs, intestines and meconium (control).

Detection of *Salmonella* bacilli's presence in analyzed samples was carried out by an accredited laboratory -VETLAB (Brudzew, Poland). In 2008, this laboratory received authorization of the Chief Veterinary Officer (no. GIWhig-5120-23/08) to perform detection of *Salmonella* bacilli by means of bacteriological-qualitative method.

*Salmonella* bacilli were not detected in analyzed samples of internal organs and intestines of one-day-old nestlings, meconium, as well as smears from boxes before insertion of nestlings. The lack of *Salmonella* bacilli or different level of its detection in case of analysis of feces from 21 days of experiment, as well as sole smears analysis on 3<sup>rd</sup>, 15<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> day of life (Table 9), and internal organs analysis of 21-days-old broilers (Figure 7) was dependent on

the box under investigation. That is, as it was anticipated, no *Salmonella* bacilli were detected in chickens from boxes 4 and 5. In case of birds from box 3, which were infected with *Salmonella* bacilli and not treated with the bacteriophage preparation, the bacilli were detected starting from sixth day of life. Whereas, in case of chickens from boxes 1 and 2, which were infected with *Salmonella* bacilli and treated with the phage agent, inhibition of bacteria propagation was clearly seen until administration of the phage preparation was stopped. What is important, the number of bacilli detected in internal organs and intestines of 21-days-old birds was very low in relation to chickens which were not treated with the phage preparation. Thus, bacteriophages prevent propagation of bacteria and consequently the appearance of bacteria in feces of birds infected during the experiment. Accordingly, it can be observed that bacteriophages decrease 200-fold the infection level even a week after discontinuation of phage treatment.

**Table 9.** Level of *Salmonella* bacilli's occurrence in feces during the experiment.

Day	Infection	Salmonella bacilli occurrence					Phage addition
		Box 1 F <sub>N</sub> +/S+	Box 2 F <sub>w</sub> +/S+	Box 3 F-/S+	Box 4 F-/S-	Box 5 F <sub>w</sub> +/S-	
1	-	-	-	-	-	-	Yes
2	-	-	-	-	-	-	Yes
3	2.5 x 10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	Yes
4	-	-	-	-	-	-	Yes
5	-	-	-	-	-	-	Yes
6	-	-	1.0 x 10 <sup>1</sup>	-	-	-	Yes
7	-	-	+	-	-	-	Yes
8	-	-	5.3 x 10 <sup>3</sup>	-	-	-	Yes
9	-	-	+	-	-	-	Yes
10	-	-	1.0 x 10 <sup>4</sup>	-	-	-	Yes
11	-	-	+	-	-	-	Yes
12	-	3.0 x 10 <sup>1</sup>	3.5 x 10 <sup>4</sup>	-	-	-	-Yes
13	-	-	+	-	-	-	Yes
14	-	2.0 x 10 <sup>3</sup>	5.5 x 10 <sup>3</sup>	-	-	-	Yes
15	4.1 x 10 <sup>3</sup>	1.0 x 10 <sup>2</sup>	1.5 x 10 <sup>3</sup>	-	-	-	No
16	+	+	+	-	-	-	No
17	2.1 x 10 <sup>2</sup>	+	3.0 x 10 <sup>4</sup>	-	-	-	No
21	5.0 x 10 <sup>2</sup>	2.2 x 10 <sup>3</sup>	4.3 x 10 <sup>4</sup>	-	-	-	No

"-" means, no *Salmonella* bacilli were detected

"+" means that *Salmonella* bacilli were detected, but it was difficult to determine their titer

*Detection of bacteriophages' occurrence.*

Samples analyzed for bacteriophage presence were collected from feces during 21 days of the experiment and from smears from all boxes before introduction of nestlings, before infection and also a day and a week after discontinuation of phage treatment. No bacteriophages were detected in internal organs. It was observed that lack of bacteriophages or different level of their detection in birds' feces (Table 10) and sole smears analyses (Table 11) depended on the given box of chicken under analysis. That is, bacteriophages were detected in feces of chickens from boxes 1, 2 and 5, which were administered the phage agent. However, their number decreased after discontinuation of the treatment, and especially in case of birds from boxes 2 and 5, where high phage concentration was used, bacteriophages were no longer detected. It is worth adding that much smaller number of bacteriophages was detected in feces from box 5 compared to feces from box 2, which can be the result of impossibility of phage's propagation due to the lack of *Salmonella* bacilli.

**Table 10.** Bacteriophage's titer level in poultry feces.

Day	Bacteriophage's titer				
	Box 1		Box 2		Box 3
	FN+/S+	FW+/S+	F-/S+	F-/S-	F+/S-
1	0	0	0	0	0
3	0	$1.8 \times 10^7$	0	0	$5.6 \times 10^2$
10	$8.0 \times 10^6$	$5.5 \times 10^4$	0	0	$5.0 \times 10^3$
15	$1.2 \times 10^7$	$5.0 \times 10^1$	0	0	$8.2 \times 10^2$
17	$1.7 \times 10^4$	0	0	0	0
21	$5.0 \times 10^1$	0	0	0	0

**Table 11.** Bacteriophage's titer level in sole smears under analysis.

Day	Bacteriophage's titer				
	Box 1		Box 2		Box 3
	FN+/S+	FW+/S+	F-/S+	F-/S-	F+/S-
One day after discontinuation of phage treatment (15)		$1.0 \times 10^5$	$1.0 \times 10^3$	0	0
					$2.4 \times 10^3$
One week after discontinuation of phage treatment (21)		$6.5 \times 10^5$	0	0	0

*Conclusions from the investigation of the effect of bacteriophage preparation on broilers*

Based on the tests performed, one can conclude that the preparation is safe and efficient.

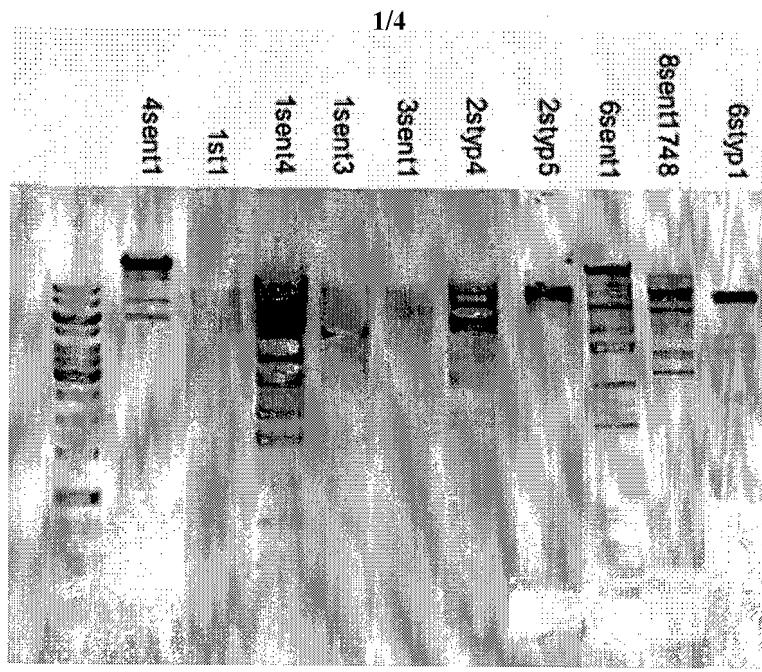
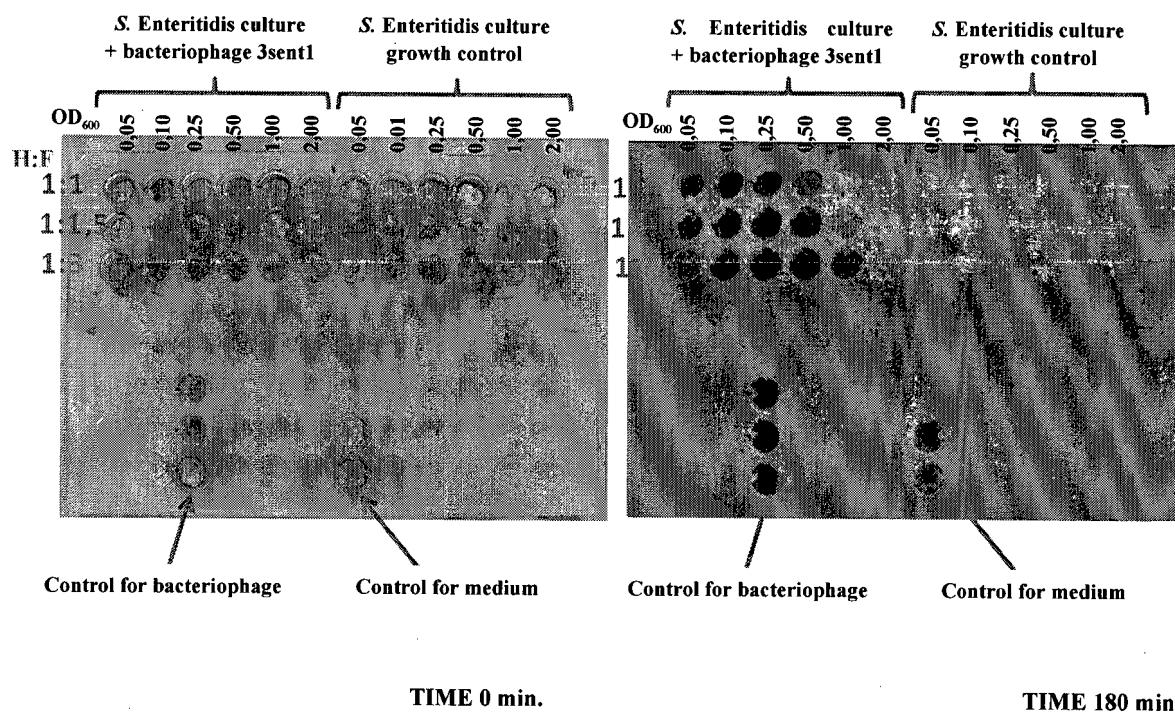
1. The preparation is safe for poultry.
2. Bacteriophages pass through the intestinal tract and reach the feces and litter.
3. Bacteriophages do not enter internal organs of the birds.
4. Bacteriophages disappear after discontinuation of administration of the preparation.
5. Bacteriophages prevent the appearance of bacteria in feces of experimentally infected birds.
6. Bacteriophages decrease 200-fold the infection level one week after discontinuation of the phage treatment.

## Claims

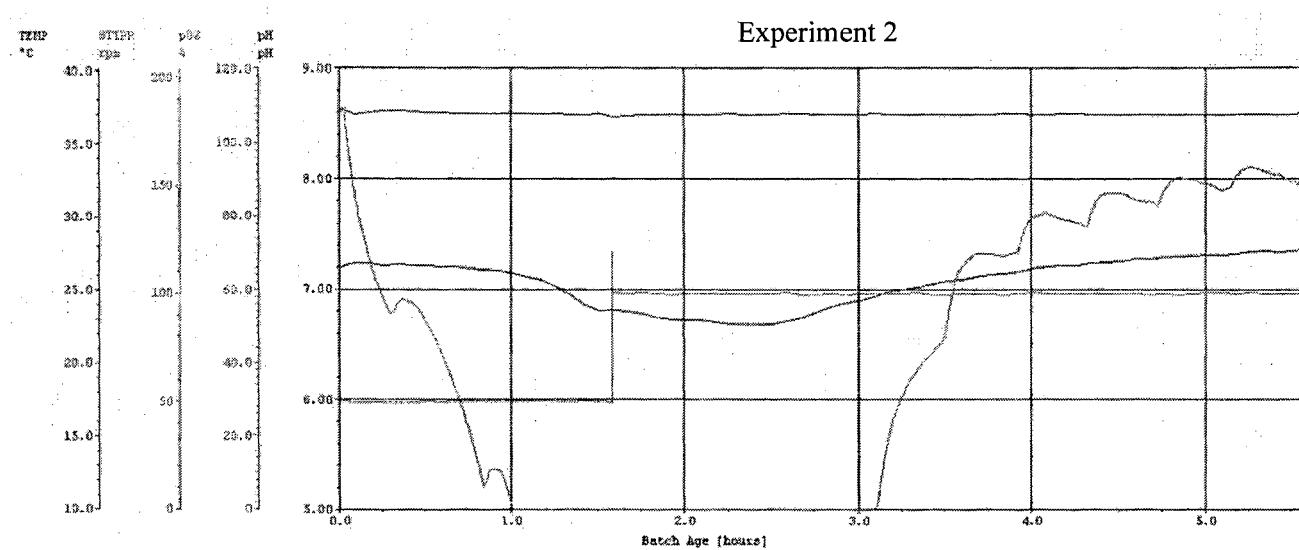
1. The method of obtaining a strain of bacteriophage specific to a selected strain of bacteria, characterized in that:
  - a) a collection of bacteriophage strains containing a strain of bacteriophage specific to a selected strain of bacteria is obtained,
  - b) culture of a selected strain of bacteria on a sterile culture medium is conducted,
  - c) the culture samples are applied on the special multi-well measuring plate, then a suspension of tested bacteriophage strain at various concentrations is added and it is incubated at 37° C for at least 4 hours,
  - d) resazurin is added to the culture samples and incubation is continued in the dark at about 37° C for at least 3 hours,
  - e) the colour or fluorescence of culture is being controlled, as well as bacteriophage strain contained in the culture that retains the blue colour or shows no significant increase in fluorescence compared with the control sample, is identified as a strain of bacteriophage specific to a selected strain of bacteria. A sterile sample that was treated with the same incubation is used as a control sample.
  - f) identified strain of bacteriophage specific to a selected strain of bacteria is propagated.
2. Method according to claim 1, characterized in that the selected bacterial strain is a strain of *S. enterica* serovar Enteritidis.
3. Application of bacteriophages in manufacturing of the preparation for preventing or fighting infections of farm animals, especially poultry, with pathogenic strains of bacteria sensitive to these phages, while the manufactured product is intended to be administered with food or water to vulnerable animals at intervals of one to seven days.
4. Method according to claim 3, characterized in that the manufactured preparation provides at least 200-fold reduction in the level of infection for a week after discontinuation of administration.
5. Method according to claim 3, characterized in that the infection to be fought is an infection of poultry with pathogenic strains of *Salmonella* sp, and in the preparation's manufacturing process, bacteriophage strain selected from the group consisting of: PCM

F/00069 (strain 8 sent in 1748), PCM F/00070 (strain 8 sent 65 ) and PCM F/00071 (strain 3 sent 1) is used.

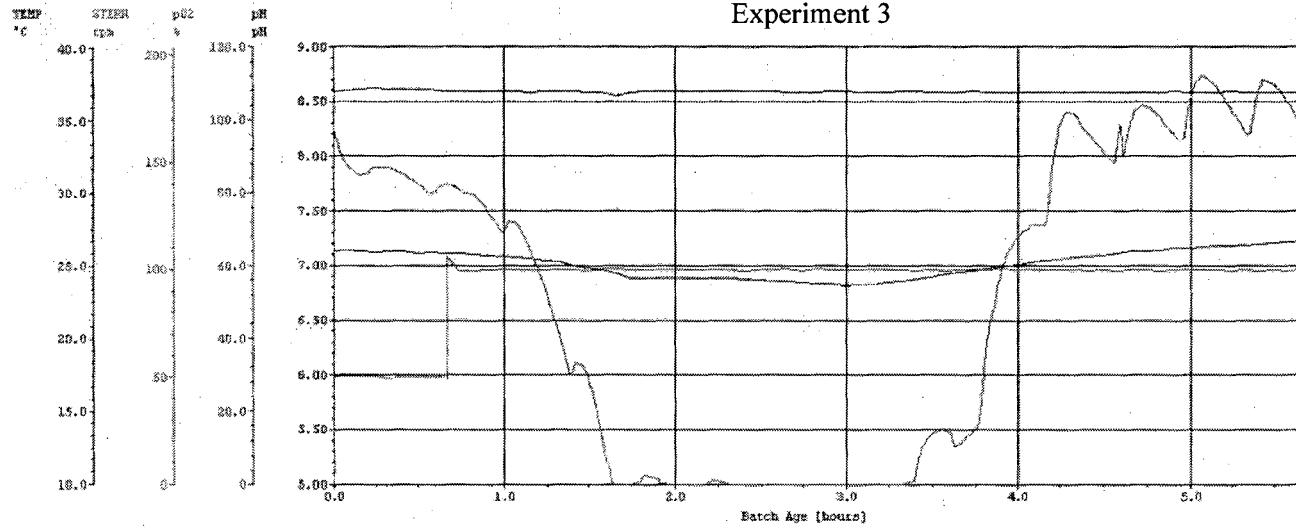
6. Bacteriophage strain suitable for the prevention or eradication of infection by pathogenic strains of *Salmonella* sp selected from the group consisting of: PCM F/00069 (strain 8 sent in 1748), PCM F/00070 (strain 8 sent 65) and PCM F/00071 (strain 3 sent 1 ) and exhibiting stability in refrigerated storage conditions for at least 3 months.

**Fig. 1*****S. enteritidis* ATCC 13076****Fig. 3**

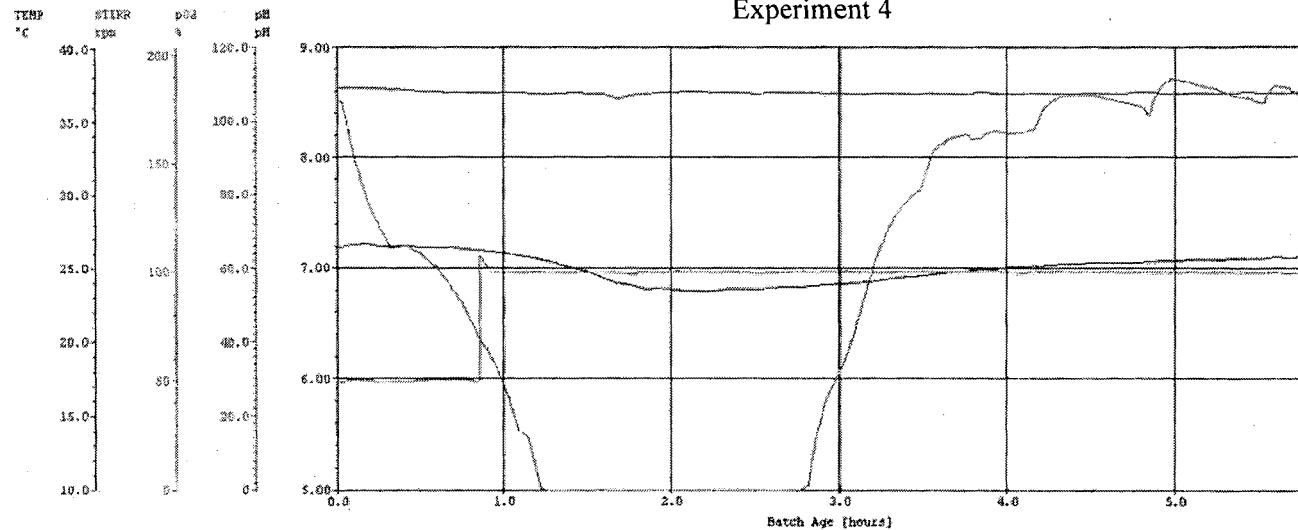
## Experiment 2

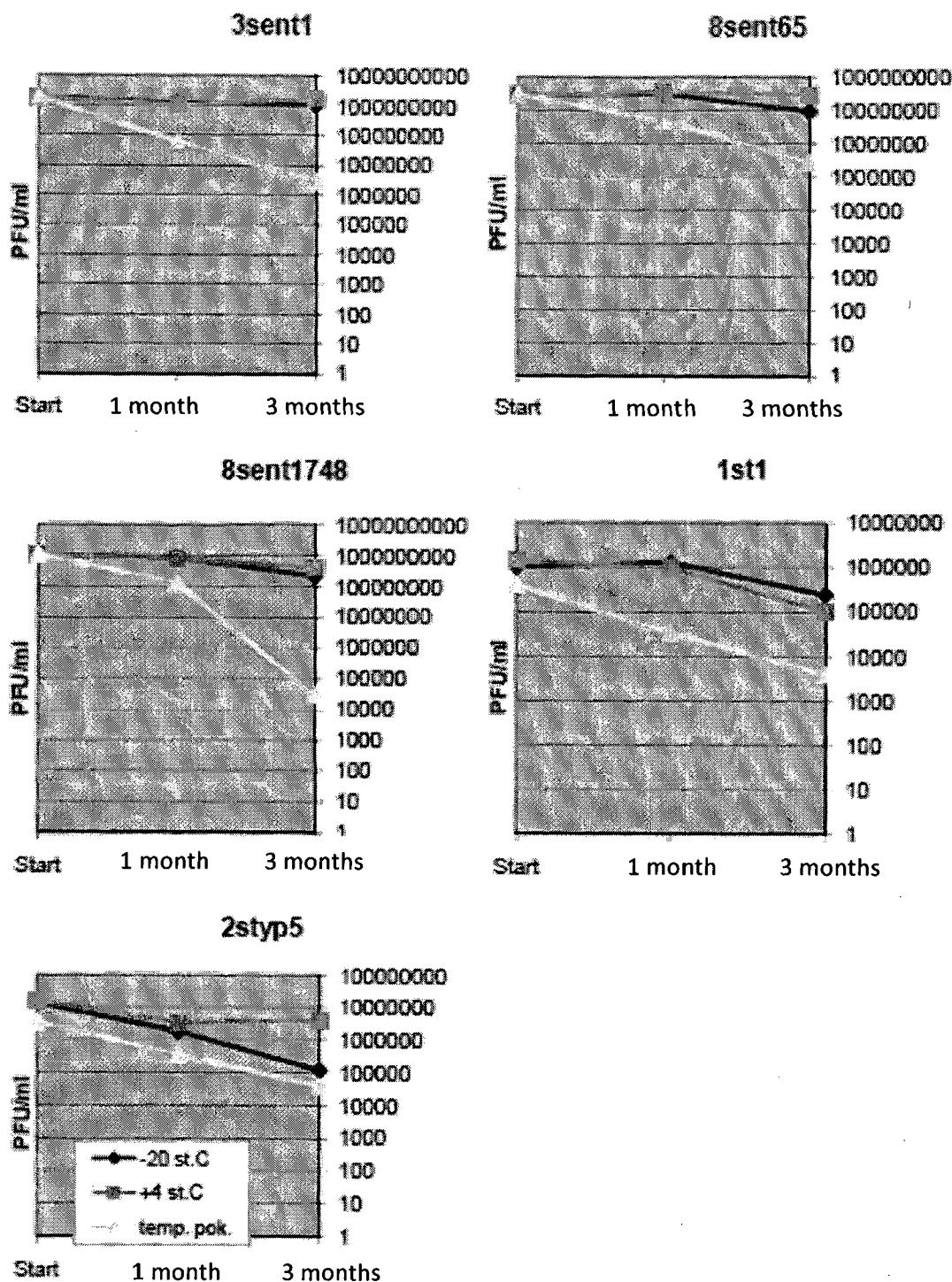


## Experiment 3



## Experiment 4

**Fig. 2**

**Fig. 4**

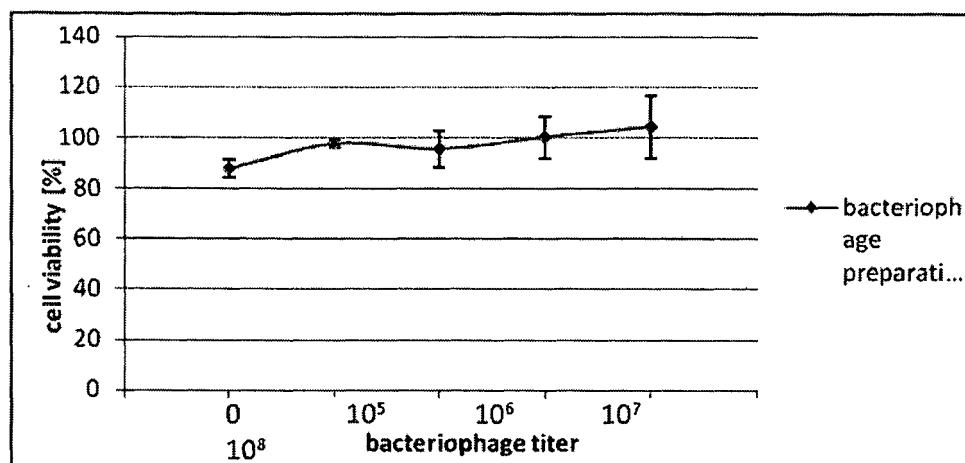


Fig. 5

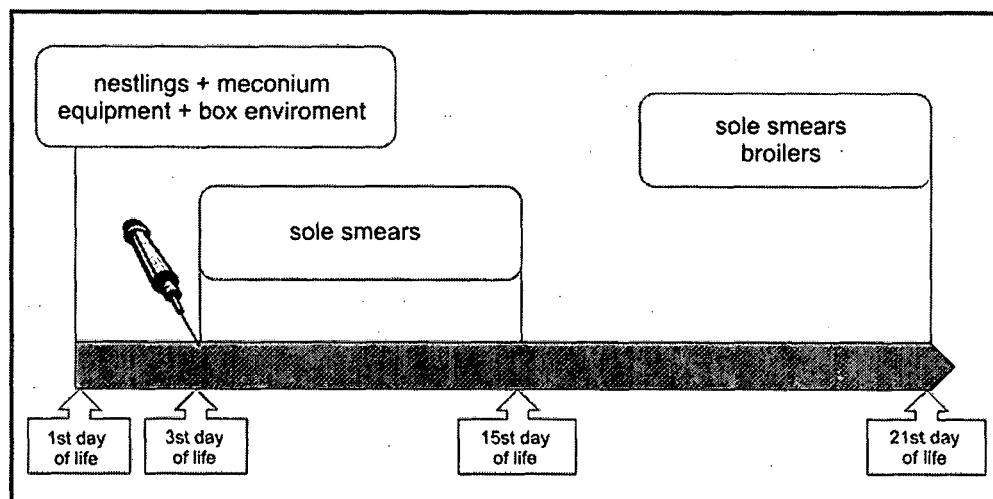


Fig. 6

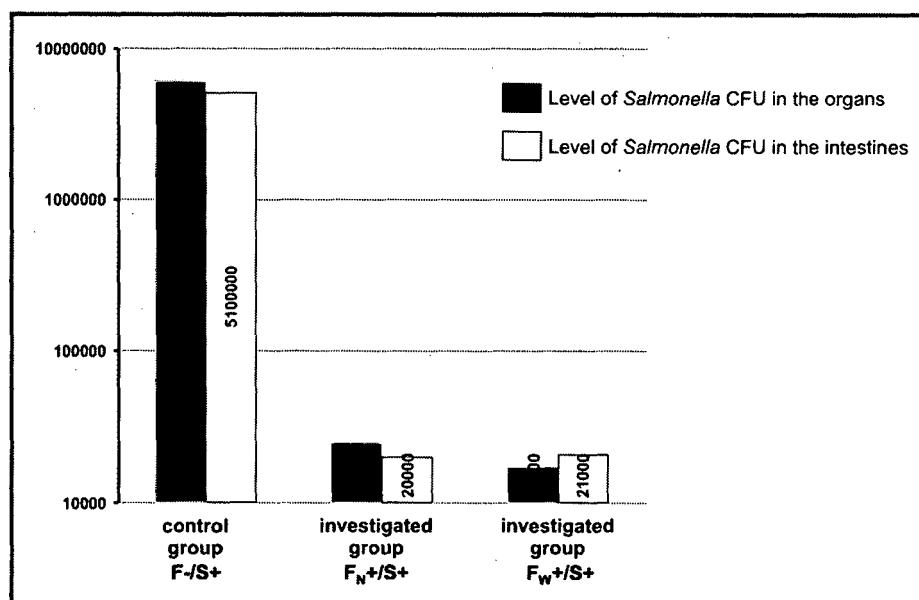


Fig 7

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2012/054070

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

INV. A23K1/00      A61K35/76      C12N7/00  
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A23K A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, FSTA, IBM-TDB

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DOOLEY E S: "Rapid visualization of the results of staphylococcal bacteriophage typing", MILITARY MEDICINE, ASSOCIATION OF MILITARY SURGEONS OF THE US, BETHESDA, MD, US, vol. 121, no. 5, 1 January 1962 (1962-01-01), pages 399-404, XP009165683, ISSN: 0026-4075 the whole document -----	1,2
X	WO 03/103578 A2 (UNIV IOWA STATE RES FOUND INC [US]; HARRIS DELBERT L [US]; LEE NAKHYUN) 18 December 2003 (2003-12-18) the whole document ----- -/-	3-6



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 January 2013

Date of mailing of the international search report

16/01/2013

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Dumont, Elisabeth

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/IB2012/054070

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2011/052544 A1 (SHIN SOO AN [KR] ET AL) 3 March 2011 (2011-03-03) the whole document -----	3-6
X	WO 03/054173 A1 (NESTLE SA [CH]; BRUESSOW HARALD [CH]; CHENNOUFI SANDRA [CH]; SIDOTI JO) 3 July 2003 (2003-07-03) the whole document -----	3-6

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No <b>PCT/IB2012/054070</b>
--

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)			Publication date
WO 03103578	A2	18-12-2003	AU 2003240505 A1 WO 03103578 A2		22-12-2003 18-12-2003
US 2011052544	A1	03-03-2011	CN 102596219 A EP 2475377 A2 US 2011052544 A1 WO 2011028059 A2		18-07-2012 18-07-2012 03-03-2011 10-03-2011
WO 03054173	A1	03-07-2003	AU 2002366854 A1 BR 0214928 A CN 1602353 A DK 1458856 T3 EP 1458856 A1 ES 2389095 T3 HK 1071400 A1 MX PA04005395 A PT 1458856 E US 2004223954 A1 US 2007134207 A1 US 2010015098 A1 WO 03054173 A1 ZA 200405513 A		09-07-2003 30-11-2004 30-03-2005 09-07-2012 22-09-2004 23-10-2012 07-03-2008 23-03-2005 06-07-2012 11-11-2004 14-06-2007 21-01-2010 03-07-2003 12-07-2005

**Universidade Federal de Minas Gerais**

**IV Simpósio de Microbiologia  
da UFMG**

**Caderno de  
Resumos**

**02 E 03**  
OUTUBRO

**Local: CAD I - Campus  
Pampulha da UFMG  
Belo Horizonte - MG**

**Ano 2017**

## PATROCINADORES

### Patrocínio Master

**BIO-RAD**



### Patrocínios



**eppendorf**

### APOIO

FUNDEP – Fundação de Desenvolvimento da Pesquisa

CENEX – Centro de Extensão do ICB – UFMG

Pró-Reitoria de Pesquisa - PRPq- UFMG

# **REALIZAÇÃO**

## **Programa de Pós-Graduação em Microbiologia**

## **COMISSÃO ORGANIZADORA**

### **Comissão Científica**

Profa. Simone Gonçalves dos Santos  
Profa. Cristina Dutra Vieira  
Profa. Daniele da Glória de Souza  
Prof. Jônatas Santos Abrahão  
Profa. Paula Prazeres Magalhães  
Profa. Susana Johann  
Profa. Vera Lúcia dos Santos

### **Discentes**

Anna Gabriella Guimarães Oliveira  
Camila Branda dos Reis  
Carla Daiane Ferreira de Sousa  
Caroline Miranda de Lima  
Cristina Alves de Oliveira Ramos  
Diogo Correa Mendonça  
Erik Vinicius De Sousa Reis  
Flávia Fonseca Bagno  
Gabriela de Melo Franco  
Gustavo José Cota de Freitas  
Indianara Machado  
Iracema Luisa Quintino de Carvalho  
Izabela Maurício de Rezende  
Jaqueline Silvana Moreira  
João Fernando G. Ferreira  
Karen Costa  
Karine Lima Lourenço  
Lethícia Ribeiro Henriques  
Lívia Sacchetto Peugo  
Lucas Vieira de Faria  
Ludmila Gouveia Eufrasio  
Mariana Silva Nunes  
Melina Aparecida Cordeiro  
Natália Lima Pessoa  
Natália Rocha Guimarães  
Paula Luize Camargos Fonseca  
Paulo Henrique Fonseca Carmo  
Paulo Victor de Miranda Boratto

Rodrigo Pereira Morão  
Thaysa Leite Tagliaferri  
Thelma Tirone Silvério Matos  
Victor Augusto Teixeira Leocádio  
Vidyleison Neves Camargos  
Vivian Correia Miranda

**Editor chefe:**  
Gabriela de Melo Franco

**Editores:**  
Camila Branda dos Reis  
Carla Daiane Ferreira de Sousa  
Lethícia Ribeiro Henriques  
Lucas Vieira de Faria  
Natália Rocha Guimarães  
Paula Luize Camargos Fonseca

**Editor de arte:**  
Paulo Henrique Fonseca Carmo

# APRESENTAÇÃO

O Programa de Pós-Graduação em Microbiologia (PPGM) da Universidade Federal de Minas Gerais do qual fazem parte os cursos de Mestrado, Doutorado, Mestrado profissional e Especialização *lato sensu*, possui atualmente 30 docentes orientadores que desenvolvem trabalhos experimentais em 17 amplas linhas de pesquisa bem consolidadas. A tradição do Curso é reconhecida nacional e internacionalmente, tendo conceito 7 na última avaliação trienal da CAPES. O Programa tem como objetivo a formação de discentes, técnica e cientificamente qualificados para o exercício das atividades profissionais de ensino, extensão e pesquisa em Microbiologia.

O Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais foi idealizado, estruturado e implantado em 1970, tendo sido criado pela resolução do Conselho Universitário de 23 de setembro do mesmo ano. A responsabilidade de sua implantação foi do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas, tendo sido oferecido inicialmente o grau de Mestrado em Microbiologia. A sua idealização e criação teve a participação marcante do Prof. Eduardo Osório Cisalpino, então diretor do ICB, tendo sido seu primeiro Coordenador o Prof. José de Alencar.

O curso de Mestrado, criado em 1970, tem acolhido estudantes com ampla variedade de objetivos e que hoje se encontram em posições acadêmicas em instituições de nível superior, como também em posições técnicas, tanto na indústria como em institutos de pesquisa aplicada. A sedimentação do Programa de Mestrado abriu perspectivas para um salto qualitativo maior que culminou com a criação do Programa de Doutorado, pelo parecer do Conselho Universitário em 17/12/1992.

A criação do curso de Doutorado, dando continuidade à Pós-Graduação em Microbiologia, objetivou fundamental e essencialmente a criação de condições para a capacitação de docentes do Ensino Superior voltados para o desenvolvimento da pesquisa, com perspectivas para a transferência do conhecimento gerado à iniciativa privada, como também, principalmente, profissionais para atender à demanda existente no País e na América Latina de um número maior de pesquisadores qualificados. A existência do Doutorado permitiu aos discentes e docentes o envolvimento em projetos de pesquisa de maior profundidade, o que tem contribuído para a melhora da qualidade da pesquisa científica em nosso país. A participação na formação de recursos humanos para a Universidade Brasileira, na área de Microbiologia, pode ser avaliada pelo destino dos egressos do Programa que hoje ocupam cargos ou funções em centros acadêmicos, de saúde ou de biotecnologia mais importantes, não só de Minas Gerais (Belo Horizonte, Diamantina, Governador Valadares, Juiz de Fora, Montes Claros, Ouro Preto, São João Del Rei, Viçosa, entre outros centros), como de outros Estados (Piauí, Santa Catarina, Sergipe, São Paulo e Maranhão, dentre outros) e países (EUA, Austrália, Angola, Áustria, Alemanha, Bolívia, Colômbia, Reino Unido, etc.).

Como o PPGM já estava consolidado em 2005 e a demanda para o Mestrado e disciplina isolada era muito alta, houve o empenho em criar a o Curso de Especialização *lato sensu* para atender à comunidade. O curso foi criado em 2005 e é ministrado na sexta-

feira, em período noturno, e no sábado, no período diurno. Este horário permite a atualização de profissionais que buscam complementar e atualizar as informações na área.

O Fórum de Microbiologia passou a integrar as atividades do ano letivo do PPGM no início dos anos 2000. A intenção, à época de sua criação, foi dar visibilidade aos trabalhos executados por estudantes do programa, assim como prover aos alunos experiência na apresentação dos dados gerados durante o desenvolvimento de suas teses e dissertações. Por alguns anos, o Fórum de Microbiologia foi um evento de cunho eminentemente local, envolvendo basicamente o Departamento de Microbiologia e a comunidade científica da UFMG. No entanto, com o passar dos anos, a adesão por parte de docentes e discentes do PPGM e da Universidade aumentou, assim como a participação externa. O ano de 2013 foi particularmente emblemático, e o IX Fórum de Microbiologia estabeleceu definitivamente sua condição de evento científico Nacional, tendo atraído a participação de mais de 370 inscritos e convidados vindos de Minas Gerais e de vários outros estados Brasileiros.

Neste ano de 2017, com a expectativa da participação de mais de 400 inscritos damos as boas-vindas aos participantes do 4º **SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG – METABOLISMO MICROBIANO: SAÚDE, AMBIENTE E BIOTECNOLOGIA**. Assim, com a certeza do sucesso deste evento, desejamos a todos os participantes uma experiência frutífera e enriquecedora nestes dois dias de apresentações, aprendizado e interações interpessoais.

São os votos da Comissão Organizadora

# AGRADECIMENTOS

Este evento só foi possível graças ao intenso esforço e apoio de diversos seguimentos:

Ao corpo docente, especialmente aos Professores Paula Prazeres Magalhães, Vera Lúcia dos Santos, Jônatas Abrahão, Susana Johann, Daniele da Glória de Souza e Cristina Dutra Vieira pelo apoio fundamental nas diferentes etapas da organização deste evento;

A comissão de seleção dos melhores resumos do evento, Professores Caio Tavares Fagundes, Betânia Paiva Drumond, Giliane de Souza Trindade, Elizabeth Neumann, Silvia Beleza de Moura, Luiz Henrique Rosa e Viviane Alves Gouveia.

Aos ilustres professores palestrantes pela disponibilidade em compartilhar conosco conhecimento científico de alta qualidade;

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, em especial à Débora Velloso e Tiago dos Santos Silva;

Aos nossos patrocinadores, pelo precioso e fundamental apoio financeiro ao evento;

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização e sucesso deste evento.

*Simone Gonçalves dos Santos.*

Profa. Simone Gonçalves dos Santos

Presidente do 4º SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG

# **AGRADECIMENTO ESPECIAL DA PRESIDÊNCIA DO IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**

Queridos Alunos da Comissão Organizadora do 4º Simpósio de Microbiologia da UFMG – Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia recebam minha profunda gratidão e sincera admiração.

A participação de vocês, de diferentes maneiras e em diferentes momentos, foi fundamental para o sucesso do Simpósio. Organizar um evento como esse é realmente um enorme desafio por diferentes motivos, no entanto isso foi superado pela perfeita consciência de vocês da importância do mesmo. Em meio às disciplinas, experimentos e trabalhos debruçaram-se muitas vezes quase *overnight* para que tudo ficasse pronto em tempo hábil, revelando aptidões e talentos muito além dos científicos.

Agradeço pela confiança, consideração e carinho demonstrados e reconheço que sem vocês não teria sido possível.

O meu muito obrigado!

*Simone Gonçalves dos Santos.*

Profa. Simone Gonçalves dos Santos

Presidente do 4º SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG



# PROGRAMAÇÃO

**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano:**  
**Saúde, Ambiente e Biotecnologia**  
**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## 02 de outubro

08:00-09:00	Credenciamento
09:00-10:00	<b>Composição da mesa e abertura do evento</b>
10:00-10:40	<b>Palestra de abertura:</b> Hilário Mantovani (UFV) - "Diversidade, função e atividade de antimicrobianos produzidos por bactérias do ecossistema ruminal".
10:40-11:10	<b>Coffee break</b>
11:10-12:00	<b>Melhores trabalhos do PPGM 2016:</b> 11:10-11:20: Monografia de Especialização: Renata de Melo Silva 11:20-11:40: Dissertação de Mestrado: Jaqueline Silva de Oliveira 11:40-12:00: Tese de Doutorado: Leonardo Borges Acúrsio
12:00-13:00	<b>Palestra técnica da Bio-Rad:</b> "PCR digital em gotas: a nova geração da PCR para quantificação absoluta". Dra Fabiana Godoy.
13:00-14:00	Almoço
14:00-16:00	<b>Mesa redonda - Biotecnologia</b> 14:00-14:30: Leandro Marcio Moreira (UFOP) - "Bioprospecção e genômica comparativa de bactérias associadas a plantas endêmicas do quadrilátero ferrífero: uma abordagem biotecnológica". 14:30-15:00: Andreas Gombert (UNICAMP) - "Modulação da conservação de energia-livre em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para o melhoramento de aplicações industriais". 15:00-15:30: Flávio da Fonseca (UFMG) Moderador - "Vaccinia virus e Reengenharia Celular: Como o Vírus Manipula as Vias de Estresse do Retículo Endoplasmático" 15:30-16:00: Discussão
16:00-16:30	<b>Coffee break</b>
16:30-19:00	<b>Sessão de Pôster e visita aos expositores</b> 16:30-17:30: Sessão I 17:45- 18:45: Sessão II

## 03 de outubro

08:00-09:30	<b>Sessão de Pôster e visita aos expositores</b>
09:30-10:30	<b>II Prêmio Cláudio Bonjardim em Microbiologia:</b> • Vidyleison Camargos • Natália Rocha Guimarães • Isabella Luísa Gurgel • Aline Daniela Júlio • Thaysa Leite Tagliaferri
10:30-11:00	<b>Coffee break</b>
11:00-13:00	<b>Mesa redonda - Saúde</b> 11:00-11:30: Anderson Miyoshi (UFMG) – "Bactérias láticas como veículos de vacinas de DNA". 11:30-12:00: Alexandre Machado (FIOCRUZ-MG) – "Genética reversa do Vírus Influenza: transformando um inimigo mortal em um aliado poderoso". 12:00-12:30: Daniel Assis Santos (UFMG) – Moderador - "Do ambiente ao hospedeiro: agroquímicos influenciam a resistência e virulência microbianas". 12:30-13:00: Discussão
13:00-14:00	Almoço
14:00-16:00	<b>Mesa redonda - Ambiente</b> 14:00-14:30: Marisa Queiroz (UFV) - "Proteínas Efetoras em <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , agente causal da antracnose em <i>Phaseolus vulgaris</i> ". 14:30-15:00: Francisco Zerbini (UFV) - "Procurando a(s) agulha(s) no palheiro: Análise de populações intra-hospedeiro de begomovírus". 15:00-15:30: Tiago Mendes (UFV) - Moderador - "Genômica comparativa e engenharia metabólica guiando a otimização de produção de antimicrobianos por microbiota ruminal e biofiltros de cianobactéria" 15:30-16:00: Discussão
16:00-16:30	<b>Coffee break</b>
16:30-16:40	Sorteios
16:40-18:00	<b>Premiação de melhores pôsteres e Cerimônia de Encerramento</b>

# APRESENTAÇÃO DOS PALESTRANTES



**Dr Hilário Mantovani**

Engenheiro agrônomo e mestre em microbiologia pela Universidade Federal de Viçosa e Doutor em Microbiologia pela Cornell University. Possui pós-doutorado pela U.S. Dairy Forage Research Center (USDA-ARS). Atualmente é professor associado do departamento de microbiologia da UFV e bolsista de produtividade do CNPq. Tem como interesses de pesquisa o estudo da microbiota associada com o desenvolvimento, desempenho e saúde animal. Também investiga estratégias alternativas ou complementares aos antimicrobianos e aditivos utilizados na produção animal.



**Dr. Flávio Guimarães da Fonseca**

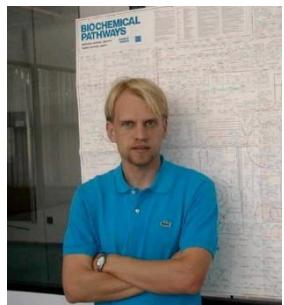
Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Minas Gerais (1993), mestrado em Ciências Biológicas (Microbiologia) pela Universidade Federal de Minas Gerais (1996) e doutorado em Ciências Biológicas (Microbiologia, ênfase em Virologia) pela Universidade Federal de Minas Gerais (2000). Realizou dois pós-Doutorados, sendo um junto ao National Institutes of Health (NIH), em Bethesda, MD, EUA (2001-2003) e o segundo realizado no Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR), Belo Horizonte, MG (2004-2005). Atualmente é Professor Associado junto ao Departamento de Microbiologia do ICB, e Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Tem experiência nas áreas de Microbiologia - com ênfase em Virologia - e Vacinologia. Através da pesquisa, ensino e extensão vem atuando principalmente nos seguintes temas: (i) Biologia molecular de vírus, principalmente dentro do grupo dos poxvírus; (ii) Epidemiologia molecular viral, particularmente do poxvírus; (iii) Desenvolvimento de imunógenos experimentais e estratégias não-clássicas de vacinação contra patógenos diversos utilizando vetores virais recombinantes (MVA), proteínas recombinantes e nanomateriais.



**Dr. Leandro Marcio Moreira**

Possui graduação em Ciências Biológicas (Bacharelado e Licenciatura Plena) pela Universidade São Judas Tadeu - SP (1995-1998), Especialização em Biologia Molecular Aplicada pela Universidade São Judas Tadeu - SP (1998-2000), Mestrado (2000 a 2002) e Doutorado (2002 a 2006) em Ciências - Modalidade Bioquímica - pelo Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Atualmente é professor Adjunto IV na área de Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Ciências Biológicas

da Universidade Federal de Ouro Preto. Tem experiência em Bioquímica e Biologia Molecular de Fitopatógenos, Genômica Estrutural e Funcional, Bioinformática e Ensino de Bioquímica e Biologia Molecular com ênfase em: (1) Análise da composição de ilhas de patogenicidade em genomas bacterianos, (2) Análise do perfil metabólico de cepas microbianas (selvagens e mutantes), (3) Análise de dados em larga escala oriundos de estudos de genômica comparativa, transcrissoma e proteoma, (4) Estudo de Microbiota associada à interação Planta-Parasita (5) Metagenômica de cavernas de canga.



### **Dr. Andreas Karoly Gombert**

O Dr. Andreas Karoly Gombert possui graduação, mestrado e doutorado em Engenharia Química pela Universidade de São Paulo. Realizou um estágio de pós-doutorado na Universidade do Minho, em Portugal, e também na Delft University of Technology, na Holanda. Obteve habilitação para Livre-Docência pela Universidade de São Paulo e atualmente é Professor Associado da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade de Campinas. O Dr. Andreas desenvolve projetos de pesquisa relacionados à Fisiologia de Leveduras e Engenharia Metabólica, na produção de biocombustíveis, enzimas, antimicrobianos e outros produtos biotecnológicos de interesse comercial.



### **Dr. Daniel de Assis**

O professor Daniel de Assis Santos possui graduação em Farmácia pela Universidade Federal de Minas Gerais, mestrado e doutorado em Microbiologia pela mesma instituição. Realizou o estágio de pós-doutorado com ênfase na interação fungo-hospedeiro na Universidade de São Paulo. Atualmente é Professor Adjunto do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. O Dr. Daniel desenvolve projetos de pesquisa na área de Micologia, relacionados ao estudo de mecanismos de resistência aos antifúngicos, de patogenicidade em diferentes modelos experimentais e na interação entre fungo e hospedeiro.



### **Dr. Anderson Miyoshi**

O Professor Anderson Miyoshi é doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Minas Gerais (2004) e professor adjunto do Departamento de Biologia Geral do ICB-UFMG (2006). Atua na área de genética molecular e de microrganismos, onde desenvolve projetos de pesquisa voltados para o desenvolvimento e avaliação funcional de novos sistemas de expressão gênica (procarióticos e eucarióticos) voltados tanto para profilaxia de doenças infecciosas quanto para novas terapias gênicas.



### **Dr. Alexandre de Magalhães Vieira Machado**

Possui graduação em Farmácia pela Universidade Federal de Minas Gerais (1994), mestrado em Microbiologia - Virologia pela Universidade Federal de Minas Gerais (1998), doutorado em Microbiologia pelo Instituto Pasteur (2002) e pós - doutorado pela Universidade Federal de Minas Gerais (2003-2006). Atualmente é pesquisador do Centro de Pesquisas René Rachou, presidente da Comissão Interna de Biossegurança (CIBio), e representante do Centro de Pesquisa René Rachou junto a Agência Nacional de Inteligência (ABIN).

Suas linhas de pesquisa consistem em: 1) Utilização da técnica de biologia molecular conhecida como genética reversa para o desenvolvimento de vetores virais influenza carreando antígenos de patógenos de interesse médico e/ou veterinário 2) Utilização da técnica de genética reversa para o desenvolvimento de vacinas contra a influenza pandêmica 3) Utilização da técnica de genética reversa para a construção de vírus influenza recombinantes carreando citocinas ou quimiocinas murinas, visando à utilização como ferramentas para o estudo da imunopatogênese durante a infecção pelo vírus influenza ou como adjuvantes vacinais. Além disso, mais recentemente, às linhas de pesquisa previamente descritas, foi incluída o estudo de mecanismos imunológicos relacionados à patogênese durante a infecção pelo vírus Zika, mais especificamente, aqueles relacionados às neuropatias periféricas atípicas.



### **Dr. Tiago Antônio de Oliveira Mendes**

O professor Tiago Antônio de Oliveira Mendes possui Graduação em Farmácia pela UFMG (2009), Mestrado em Parasitologia pela UFMG (2011) e Doutorado em Bioinformática pela UFMG com período sanduíche no European Molecular Biology Laboratory (EMBL-Heidelberg, Alemanha). Foi residente Pós-doutoral do Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG.

Atualmente é Professor Adjunto A do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV e membro convidado do European Molecular Biology Laboratory Alumni Association. Coordena o grupo de pesquisa Biologia Sintética e Modelagem de Sistemas Biológicos. Possui experiência em bioinformática com ênfase em biologia de sistemas aplicada a estudo de genomas e proteomas, métodos in silico de reconstruções de metabolomas e interatomas e bioinformática estrutural aplicada a modelagem e desenho de drogas terapêuticas. Também participa de projetos relacionados com biologia molecular e imunologia de protozoários parasitos e projetos de biologia sintética e engenharia de proteínas aplicados a saúde humana e animal e a agronomia.



### **Dra. Marisa Vieira de Queiroz**

A professora Marisa Vieira de Queiroz, possui graduação em Ciências Biológicas- Bacharelado pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (1985), mestrado e doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas pela Universidade de São Paulo (1988 e 1993). Realizou quatro estágios pós-doutorais na França e nos Estados Unidos. Atualmente, é professora titular da Universidade Federal de Viçosa. Tem experiência na área de Genética, com ênfase em Genética Molecular de Micro-organismos, atuando principalmente nos seguintes temas: genética de fungos fitopatogênicos, endofíticos e produtores de enzimas de interesse industrial.



### **Dr. Francisco Zerbini**

O professor Francisco Zerbini é engenheiro agrônomo e Mestre em fitopatologia pela Universidade Federal de Viçosa e doutor em fitopatologia pela Universidade da California. Atualmente é professor titular no departamento de Fitopatologia da UFV, atuando principalmente na área de fitopatologia com ênfase em virologia vegetal e genética de interação patógeno-hospedeiro. Também faz parte do Comitê Executivo do International Committee on Virus Taxonomy (ICTV) e dos Grupos de Estudo de Geminiviridae e Potyviridae do ICTV.

# PRÊMIO PROFESSOR CLÁUDIO ANTÔNIO BONJARDIM



O Simpósio de Microbiologia da UFMG traz o prêmio Professor Cláudio Antônio Bonjardim, criado na edição de 2016 (III Simpósio de Microbiologia da UFMG – Doenças Microbianas Emergentes). Inspirado no criador do Simpósio, antes denominado Fórum de Microbiologia, o prêmio reúne os melhores trabalhos, selecionados pela comissão de Professores do Departamento de Microbiologia.

O professor Cláudio Antônio Bonjardim possui graduação em Farmácia e Bioquímica pela Universidade de São Paulo (1980), obtendo seu doutorado em Bioquímica - Departamento de Bioquímica (Instituto de Química-USP) em 1985. Realizou estágio Pós-doutoral em Biologia Molecular/Expressão Gênica no Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer/SP (1985-1987) e Transdução de Sinal Desencadeado por Citocinas no Imperial Cancer Research Fund - Londres (1992-1994). É Professor Titular da Universidade Federal de Minas Gerais - Departamento de Microbiologia. Tem experiência nas áreas de Bioquímica/Biologia Molecular/Celular e Microbiologia, com ênfase em VIROLOGIA e CITOCINAS, atuando principalmente nos seguintes temas: Interação Vírus-Hospedeiro, Prospecção de Antivirais, Vírus e Mitogênese, utilizando como modelo os *Orthopoxvirus* (*Vaccinia virus* e *Cowpox virus*), além dos Flavivírus (Dengue e Febre Amarela), realizando estudos tanto in vitro, como in vivo. Organizou e Coordenou o Fórum de Microbiologia durante os anos de 2005 a 2007. Foi Coordenador do Programa de Pós-graduação em Microbiologia (09/2009 a 10/2014) e atualmente é Coordenador Adjunto do Mestrado Profissional em Microbiologia, Área CBIII (CAPES), desde 07/2013.



## TRABALHOS SELECIONADOS PARA O PRÊMIO CLÁUDIO ANTÔNIO BONJARDIM

### ÁREA: AMBIENTAL

#### CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE UMA PROTEÍNA HOMÓLOGA À MSB2 EM *Aspergillus fumigatus*

GURGEL, I.L.S<sup>1</sup>; JORGE, K.T.O.S<sup>1</sup>; FERNANDES, M.F<sup>1</sup>; SORIANI, F.M<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Genética Funcional, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil. Email: isabellalsg@ufmg.br

*Aspergillus fumigatus* (Afu) é um fungo filamentoso causador de aspergilose pulmonar invasiva em indivíduos imunocomprometidos, sendo considerado, portanto, um importante patógeno humano. Em microorganismos, a sinalização celular e as adaptações da parede celular são cruciais para a manutenção de processos fisiológicos e virulência. Nesse contexto, Msb2 é uma proteína mucina de sinalização importante em diversos organismos. Em *Candida albicans*, atua modulando a ativação da via de sinalização Cek1 dependente de MAPK, regulando o crescimento filamentoso. Já em *Saccharomyces cerevisiae* é conhecida como sensor osmótico na via HOG. Devido à relevância dessa proteína, o objetivo do presente trabalho é a caracterização funcional da proteína homóloga à Msb2 em Afu. Para isso foi construída uma linhagem mutante ( $\Delta msb2A$ ) com deleção total do gene por recombinação homóloga. Nossos resultados mostraram que *msb2A* participa do crescimento vegetativo e reprodutivo, com o mutante apresentando redução significativa do diâmetro da colônia e da esporulação. Para o melhor entendimento desses fenótipos, os passos iniciais da formação do tubo germinativo foram analisados e a linhagem  $\Delta msb2A$  demonstra um atraso significativo no crescimento polarizado. Além disso, a ausência de *msb2A* confere ao conídio maior capacidade de adesão e maior produção de biofilme. Adicionalmente, a linhagem mutante apresenta maior susceptibilidade a estresse de parede celular, osmótico e antifúngicos. Por fim, em relação à interação microrganismo-hospedeiro, ensaios *in vitro* mostraram que a ausência de *msb2A* altera o reconhecimento da linhagem mutante por macrófagos, apresentando redução do índice fagocítico e menor killing. Em conjunto os resultados sugerem que a proteína Msb2A participa do crescimento, altera as propriedades de adesão e, possivelmente, afeta a composição da parede celular, de modo a aumentar a sensibilidade a agentes estressores e antifúngicos e modificar o reconhecimento por fagócitos.

**Palavras chaves:** *Aspergillus fumigatus*; Msb2; Parede Celular.

**Fonte de Financiamento:** CAPES; CNPq; FAPEMIG



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

### **ANÁLISES METATAXONÔMICAS REVELAM DIFERENÇAS NA ESTRUTURA DA COMUNIDADE BACTERIANA EM AMOSTRAS DE AQUÍFEROS COM DIFERENTES NÍVEIS DE CONTAMINAÇÃO POR CREOSOTO E SEU POTENCIAL PARA USO NA BIORREMEDIACÃO *IN SITU***

Julio, A.D.L.<sup>1</sup>; Silva, U.C.<sup>1</sup>; Leite, L.R<sup>1</sup>; Medeiros, J.D.<sup>2</sup>; Kumazawa, D.S<sup>3</sup>; Santos, V.L<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Microbiologia Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. E-mail: alinejulio19@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Grupo de Genômica e Biologia Computacional, Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, Belo Horizonte Minas Gerais

<sup>3</sup> Instituto de Microbiologia, Academia Tcheca de Ciências – CAS, Praga, República Theca.

Neste trabalho, utilizamos abordagem metataxonômica para estudar a estrutura da comunidade bacteriana de aquífero contaminado com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), por fornecer informações sobre os grupos ali presentes sem necessidade de cultivo. Isso permite compreender alterações nessas comunidades em resposta ao estresse e inferir seu potencial de uso na biorremediação *in situ* por biostimulação. Foram coletadas amostras em 8 pontos de um aquífero com diferentes níveis de contaminação por creosoto localizado em uma área no Espírito Santo. O DNA foi extraído, amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores 341F e 806R e a biblioteca sequenciada no Miseq da Illumina. A classificação taxonômica e análises de diversidade dos reads foi feita utilizando o pacote QIIME. As amostras com altos níveis de HPAs apresentaram riquezas e diversidades menores que as demais, de acordo com os índices de Shannon e Simpson ( $p<0.05$ ). Pela análise de coordenadas principais (PCoA), usando as matrizes de distância do Unifrac ponderado e não ponderada ( $\beta$  diversidade), as amostras se agruparam em função dos níveis de contaminação. Análises usando o pacote EdgeR do programa R mostraram variação significativa na abundância de OTUs, e enriquecimento de taxons que se correlacionaram de forma positiva e significativa com os hidrocarbonetos, o que foi confirmado por análise de Redundância (RDA). Todos esses táxons enriquecidos já foram caracterizados como degradadores de HPAs, como os gêneros *Comamonas*, *Geobacter*, *Hydrocarboniphaga*, *Anaerolinea* e *Desulfomonile*. Adicionalmente, foi possível predizer, com o uso do programa PICRUSt, uma proporção maior de vias e genes relacionados à degradação de HPAs nas amostras com altos níveis dos contaminantes em relação as demais. Conclui-se que os contaminantes promoveram o enriquecimento de diversos grupos de bactérias degradadoras na área, o que robustece a viabilidade de aplicação da biostimulação como estratégia de remediação do aquífero.

**Palavras Chaves:** Metataxonômica, Biorremediação, Aquíferos, Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

**Apoio Financeiro:** CNPq, Vale



## **ÁREA: BIOTECNOLOGIA**

### **EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE SUBSTÂNCIA ANTIMICROBIANA ATIVA CONTRA AMOSTRA MULTIRRESISTENTE DE *Acinetobacter baumannii* E SEQUENCIAMENTO DO PLASMÍDIO SELVAGEM**

Guimarães, N. R.<sup>1</sup>; Silva, C. P.<sup>1</sup>; Batista, T. M.<sup>2</sup>; Tagliaferri, T. L.<sup>1</sup>; Brito, G. A. M.<sup>2</sup>; Santos, S. G.<sup>1</sup>; Farias, L. M.<sup>1</sup>; Magalhães, P. P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, Departamento de Microbiologia; <sup>2</sup>Laboratório de Genética e Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: natyroguiaman@yahoo.com.br

A resistência bacteriana a drogas antimicrobianas constitui um problema de saúde pública grave e emergente, de proporções mundiais. Para o controle efetivo das doenças infecciosas, a busca por novos antimicrobianos, inclusive não convencionais, é fundamental. Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a expressão de substância antimicrobiana pelo sistema *E. coli* BL21 transformado com plasmídio selvagem e sequenciar o plasmídio em busca do gene que codifica a substância. A molécula de DNA selvagem foi introduzida em *E. coli* BL21 quimiocompetente por choque térmico. Após verificação da eficiência da transformação, a expressão da substância antimicrobiana foi avaliada pelas técnicas de sobrecamada e extração ácida. A atividade antimicrobiana foi confirmada e titulada pela técnica de *spread plate*, empregando-se, como reveladora, uma amostra clínica de *A. baumannii* multirresistente. Para sequenciamento do plasmídio, foram construídas bibliotecas *paired-end* e as *reads* geradas (301 pb) foram sequenciadas usando o sequenciador Illumina MiSeq. A qualidade das *reads* foi analisada empregando-se o software FASTQC e a montagem *de novo* foi realizada utilizando-se o algoritmo Spades 3.10.1. A análise preliminar de similaridade foi realizada usando o Blastx. A expressão do antagonismo foi observada e o título de atividade antimicrobiana foi de 640 UA/mL. A transformação em sistema *E. coli* BL21 permitiu a obtenção de grande quantidade da substância antimicrobiana, em meios de cultura básicos, produzida por linhagem não patogênica, o que favorece as etapas posteriores de purificação e reforça seu potencial biotecnológico. Os resultados demonstram que o gene que codifica a substância antimicrobiana está presente no plasmídio selvagem. A montagem plasmidial gerou um *contig* de 11,060 pb. Dados preliminares da análise por similaridade permitem-nos hipotetizar que um gene de 463 pb está, possivelmente, relacionado à expressão da substância antimicrobiana.

**Palavras-chave:** Substâncias antimicrobianas, *Acinetobacter baumannii*, clonagem, sequenciamento

**Apoio Financeiro:** CNPq, CAPES, FAPEMIG e PRPq/UFMG.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

### **REVERSAL OF B-LACTAM RESISTANCE IN LABORATORIAL AND CLINICAL SAMPLES USING CRISPR-CAS9 TECHNOLOGY**

Tagliaferri, T.L.<sup>1</sup>; Pereira, M.P.M.<sup>1</sup>; Guimarães, N. R.<sup>1</sup>; Arantes, A.J.R.<sup>1</sup>; Vilela, L.F.F. <sup>2</sup>; Mendes, T.A.O.<sup>3</sup>; Santos, S.G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, Departamento de Microbiologia, <sup>2</sup>Laboratório de Biologia Sintética e Biomiméticos, Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG. <sup>3</sup>Laboratório de Biologia Sintética e Biologia de Sistemas, Departamento de Bioquímica, UFV.

Considering that the emergence and spreading of antimicrobial resistant mechanisms is much faster than the discovery of new antimicrobials, alternative methods for reversing resistance have significant impact for clinical field. Among these methods, CRISPR-Cas9 system represents an opportunity to develop a specific tool to turn off the production of resistance proteins due to its ability of accurate DNA cleavage and edition. The aim of this study is to revert resistance codified by *blaTEM* gene using the CRISPR-Cas9 technology. First, a gRNA was designed using Pearl scripts to target specifically a conserved region of *blaTEM* gene. The selected sequence was synthesized and inserted in the CRISPR-Cas9 vector. The functionality of genetic device was proven by qPCR. *E. coli* BL21 was transformed with other 2 plasmids, the first containing RFP and the *blaTEM* gene to evaluate integrity of resistance plasmid after edition and the second with GFP to evaluate the viability of culture. The phenotype reversal was assessed by growth curve in the presence and the absence of antibiotic. The *blaTEM* gene was sequenced and had its expression evaluated after edition. CRISPR-Cas9 system was also applied in a clinical sample of *E. coli*. A conserved gRNA sequence localized in the 5'-end of the gene was synthetized. The Cas9 expression was observed in the controls and experimental samples by qPCR using the 16S rRNA as endogenous gene. Growth curve demonstrated phenotypic resistance reversal in *E. coli* model. Plasmids integrity and viability were proved by RFP and GFP fluorescence after gene edition. Sequencing of the edited gene showed frameshift mutation and the expression of *blaTEM* was reduced. The clinical sample of *E. coli* was re-sensitized to 5 antimicrobials, including penicillin and cephalosporins of 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> generation. To conclude, CRISPR-Cas9 was able to revert resistance with the designed gRNA of laboratorial samples as well as clinical ones.

**Palavras-Chave:** CRISPR-Cas9; Antimicrobial resistance; *blaTEM*; Resistance reversal.

**Apoio Financeiro:** Fapemig; Capes; CNPq; PRPq/UFMG.



## ÁREA: SAÚDE

### EARLY PRENATAL *Zika virus* INFECTION OF PREGNANT IMMUNOCOMPETENT MICE INDUCES NEURODEVELOPMENTAL AND OPHTHALMOLOGICAL ABNORMALITIES OF THE OFFSPRING

CAMARGOS, V. N.<sup>1\*</sup>; FOUREAUX, G.<sup>2</sup>; DA SILVEIRA, V. T.<sup>3</sup>; MATOSINHOS, A. L. B.<sup>3</sup>; SOUZA, J. M.<sup>4</sup>; OLMO I. G.<sup>4</sup>; MEDEIROS, D. C.<sup>5</sup>; MOURAO, F. A. G.<sup>6</sup>; MOREIRA, T. P.<sup>1</sup>; BAMBIRRA, J. L.<sup>1</sup>; QUEIROZ, V. F.<sup>1</sup>; SOUSA, C. D. F.<sup>1</sup>; ROCHA, R. P. F.<sup>4</sup>; QUEIROZ-JUNIOR, C. M.<sup>2</sup>; TEIXEIRA, A. L.<sup>7</sup>; MENDES, E. M. A. M.<sup>5</sup>; MORAES, M. F. D.<sup>6</sup>; RIBEIRO F. M.<sup>4</sup>; OLIVEIRA, A. C. P.<sup>3</sup>; TEIXEIRA, M. M.<sup>4</sup>; COSTA, V. V.<sup>2</sup>; SOUZA, D. G.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia, ICB/UFMG, Brazil. <sup>2</sup>Departamento de Morfologia, ICB/UFMG, Brazil.

<sup>3</sup>Departamento de Farmacologia, ICB/UFMG, Brazil. <sup>4</sup>Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB/UFMG, Brazil. <sup>5</sup>Departamento de Engenharia Eletrônica, Escola de Engenharia/UFMG, Brazil.

<sup>6</sup>Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB/UFMG, Brazil. <sup>7</sup>Department of Psychiatry & Behavioral Sciences, University of Texas Health Science Center at Houston, USA. \*E-mail: [yncamargos@gmail.com](mailto:yncamargos@gmail.com)

*Zika virus* (ZIKV) infection is a global health emergency associated with serious neurological complications. Recently, World Health Organization adopted additional criteria to diagnose ZIKV, suggesting a more complex range of symptoms than microcephaly in babies born from infected mothers. Indeed, it is known that several infections during pregnancy may be related to the development of different neuropsychiatric disorders secondary to changes in the neurodevelopmental process, suggesting a relationship between the immune system and the brain development. Those consequences on the offspring from ZIKV-infected dams are still not clear. Thus, our aim was to evaluate the effects of early ZIKV infection on the neurodevelopmental and ophthalmological abnormalities of the offspring born from infected dams. Additionally, we also evaluated the potential role of antibody-dependent enhancement in the exacerbation of those abnormalities. C57BL/6 pregnant dams were inoculated with ZIKV (HS-2015-BA-01 strain) in the presence or absence of pan-flavivirus antibody (4G2). Negative and positive dam controls were injected with PBS or polyinosinic-polycytidylic salt (poly I:C), respectively. Intraocular pressure (IOP), behavioral tests and magnetic resonance imaging (MRI) started at four, eight and twelve-week age of offspring, respectively. A marked increase in IOP levels, indicative of ophthalmological abnormality, was detected in the offspring of 4G2-ZIKV inoculated dams in comparison to ZIKV and PBS littermates. Additionally, behavior analysis revealed alterations on basal locomotion, indicative of anxiety-like behavior. Interestingly, MRI revealed reduction in whole brain volume of all infected groups in comparison to PBS control. Thus, our results reveal that early maternal ZIKV infection is associated to behavioral alterations of the offspring in adulthood. These results provide insights on clinical and neurodevelopmental consequences of early maternal ZIKV infection.

**Keywords:** Zika virus, Arbovirus, Flaviviridae, Neurodevelopment, Immunocompetent mice

**Financial support:** INCT Dengue, CAPES, CNPq, FAPEMIG, FINEP.



## TRABALHOS SELECIONADOS PARA PÔSTER

02/10/2017 – 16:30

### ÁREA: AMBIENTAL

Número: 001

#### AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DO MILHO EM ANTAGONIZAR PATÓGENOS DESTA CULTURA

Santos, S. R. C.<sup>1</sup>; Silva, U<sup>1</sup>; Vieira, J.A.C.<sup>1</sup>; Santos, V. L<sup>1</sup>

Laboratório de Microbiologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. E-mail: [s.regina97@yahoo.com.br](mailto:s.regina97@yahoo.com.br)

O potencial de bactérias endofíticas em antagonizar patógenos as tornam candidatas a substituir totalmente ou parcialmente o uso de pesticidas químicos em culturas de valor comercial, como o milho. O objetivo do trabalho foi avaliar o potencial de bactérias endofíticas de milho em antagonizar os fungos *Fusarium verticiliooides* e *Stenocarpella maydis* e a bactéria *Pantoea ananatis*, importantes patógenos do milho. Foram testadas 36 bactérias do gênero *Bacillus* grupo Subillis. Para avaliar a atividade contra os fungos, alíquotas de cerca de 10 µL de suspensões bacterianas contendo  $3 \times 10^8$  UFC/mL (escala de Mcfarland 1) foram estriadas em meio de cultura BDA nos quadrantes das placas a 1 cm das bordas, em duplicita. Discos de micélio dos fungos patogênicos foram adicionados no centro da placa e após 7 dias de incubação a 30°C, efetuou-se a medida do halo de inibição do crescimento comparado ao controle (placa sem a bactéria). Das 17 bactérias testadas contra os fungos, o maior efeito foi observado para o isolado BAC 9 para *F. Verticiliooides* e o isolado -BAC 6 para *S. maydis*. Nos ensaios de antagonismo contra *P. ananatis*, suspensões das bactérias endofíticas (3µL) foram depositadas na superfície de meio TSA e incubadas em estufa à 37°C por 24 horas. Concomitantemente, a bactéria fitopatogênica foi crescida em caldo TSB a 37°C por 24 horas e 0,1 mL da cultura obtida foi transferida para tubos contendo TSB semi-sólido (0,6% de ágar) fundido a 45°C. A mistura foi vertida sobre as placas contendo os “spots” das bactérias endofíticas previamente expostas a vapor de clorofórmio por 20 minutos. Após 48h a 37°C, avaliou-se a presença de halos de inibição do crescimento da bactéria fitopatogênica. No total, 19 bactérias inibiram *P. ananatis*, sendo o maior efeito observado para o isolado BC1. Assim, conclui-se que as bactérias do gênero exercem atividade antagonista contra os fitopatógenos testados, sendo potenciais agentes de biocontrole.

**Palavras - Chave:** microrganismo, antagonismo, controle biológico

**Apoio Financeiro:** Fapemig, CNPq, Embrapa e Capes



## **RESUMOS**

**Número: 002**

### **ALTERAÇÃO DA ESTRUTURA DA COMUNIDADE BACTERIANA DE AMOSTRAS DE SEDIMENTO AO LONGO DE ENRIQUECIMENTO COM FENOL, CREOSOTO E CARACTERIZAÇÃO DAS BACTERIAS ISOLADAS QUANTO À PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ATIVOS DE SUPERFÍCIE (CAS)**

Souza, A. B<sup>1</sup>.; Alves, N. L. de S.; Julio, A. D. L.; Santos, V. L. dos

<sup>1</sup>Laboratorio de Microbiologia Aplicada (LMA), Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antonio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, 31270-901. Correspondência: alinebernardes.souza@gmail.com

O sucesso do uso da biorremediação baseada em bioaumentação para tratar ambientes contaminados é dependente da existência de inoculantes com alto potencial catabólico e produtores de Compostos Ativos de Superfície (CAS), capazes de aumentar a disponibilidade de contaminantes hidrofóbicos à biodegradação. Neste contexto, o estudo visou a prospecção de bactérias produtoras de CASs a partir de amostras de uma lagoa contaminada com creosoto. Foi usada a técnica de enriquecimento baseada em 3 cultivos sucessivos em meio mineral com fenol (100mg/L) ou creosoto (10% v/v) por 7 dias a 30°C e 150rpm. A cada semana, alíquotas foram coletadas para extração de DNA e análise por PCR e Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação (DGGE) para monitorar a estrutura da comunidade bacteriana. 43 morfotipos foram isolados, crescidos em meio com Fenol -5 e 10 mmol/L, creosoto (1% v/v) ou glicose (1% v/v) e avaliados quanto à atividade surfactante e emulsificante ( $E_{24}$ ). Os resultados do PCR-DGGE sugerem que a estrutura da comunidade foi afetada de forma diferente pelas fontes de carbono e que houve seleção de microrganismos, pois o padrão de bandas das amostras antes do enriquecimento e ao final da terceira semana foi dissimilar. A fonte que resultou nas maiores médias tanto de atividade surfactante quanto emulsificante foi a glicose. Para 25% dos isolados, a tensão superficial foi em torno de 40 mN/m, independente da fonte de carbono utilizada, com destaque para *Nubsella sp* 1FM12, *Bacillus sp* 3FM3 e *P. Mosselii* 4C10M1. As fontes de carbono que resultaram nas maiores médias de  $E_{24}$  após a glicose (46,71%) foram fenol 5 mmol/L (25,23%), creosoto (22,72%) e fenol 10 mmol/L (19,1%) e 35% dos isolados atingiram valores próximos de 50%, chegando a 75,95% para *P. mosselii* 4C10M1. Os resultados indicam que o enriquecimento alterou a estrutura da comunidade das amostras e permitiu o isolamento de bactérias produtoras de CAS, com potencial de uso para a remediação da área contaminada.

**Palavras Chave:** Biorremediação, Fenol, Creosoto, de PCR com Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação Compostos Ativos de Superfície;

**Apoio financeiro:** Capes, Vale



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 003**

**DETERMINAÇÃO DE MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE DE TENSOATIVO CATIÔNICO PRESENTE EM CONDICIONADOR CAPILAR**

Cruz; G. A.<sup>1</sup>; Silva, G. A. G.<sup>1</sup>; Vieira, M. L. A.<sup>1</sup>; Nunes, G. F. M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Química, Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET/MG), Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: [gabriella.alves94@hotmail.com](mailto:gabriella.alves94@hotmail.com)

O consumo de tensoativos tem se elevado nos últimos anos devido às suas possibilidades de aplicação, estando presentes em diversos produtos comerciais. No entanto, também vem crescendo os problemas ambientais relacionados a estas substâncias, pois seus resíduos, muitas vezes descartados no meio ambiente, provocam grandes impactos à fauna e flora. A partir disso, torna-se necessário avaliar a biodegradabilidade destes produtos, prevendo se os mesmos serão prejudiciais ao ambiente. Os tensoativos que causam maiores danos são, em geral, os sintéticos não biodegradáveis e, para minimizar esses impactos, surgiram como alternativa os biodegradáveis. O objetivo deste trabalho foi avaliar um método para quantificação da biodegradabilidade de tensoativos catiônicos presentes em condicionadores capilares comerciais. Para isso foi empregado um procedimento analítico colorimétrico, uma das técnicas mais usadas na determinação de surfactantes em soluções aquosas. Como corante foi utilizado o tiocianato de cobalto. A curva analítica para o cloreto de cetil trimetil amônio (CCTA) com concentrações entre 1,0 mg·L<sup>-1</sup> e 50,0 mg·L<sup>-1</sup> apresentou boa linearidade ( $R= 0,9998$ ) mostrando que o método proposto foi adequado para esta determinação. Na sequência foi avaliada a biodegradação da solução padrão do tensoativo catiônico (CCTA) e do mesmo tensoativo extraído de um condicionador comercial utilizando o método determinado para a quantificação. Como inóculo foi utilizado uma suspensão de microrganismos obtidos de solo de jardim. A biodegradação do tensoativo das soluções estudadas foi avaliada monitorando quantitativamente sua concentração durante um período de 11 dias. Os resultados revelaram que o tensoativo catiônico, tanto do padrão de CCTA, quanto o extraído de condicionador comercial, foram biodegradados pelos microrganismos do inóculo apresentando uma boa taxa de biodegradação (> 90%).

**Palavras chave:** Biodegradação. Tensoativo catiônico. Condicionador.

**Agradecimentos:** CEFET/MG e FAPEMIG.



## **RESUMOS**

**Número: 004**

### **EFICIÊNCIA DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS E RIZOBACTÉRIAS DE MILHO NA SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO DE FERRO**

Batista, F.C.<sup>1</sup>; Abreu, C.S.<sup>2</sup>; Oliveira, M.C.<sup>3</sup>; Ribeiro, V.P.<sup>4</sup>; Costa, J.C.<sup>1</sup>; Marriel, I.E.<sup>3</sup>; Gomes, E.A.<sup>3</sup>; Lana, U.G.P.<sup>3</sup>; Oliveira, C.A.<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>UNIFEMM-Centro Universitário de Sete Lagoas, MG. <sup>2</sup>Laboratório de Micologia, Departamento de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. <sup>3</sup>Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. <sup>4</sup>UFSJ, São João Del Rei, MG.

Os solos tropicais das áreas agrícolas do Brasil apresentam condição ácida e predomínio de fosfato de ferro (P-Fe), o que resulta em baixa disponibilidade de fósforo (P) para as plantas. Para suprir essa carência é necessária a aplicação de grandes quantidades de fertilizantes fosfatados. Alternativamente, alguns microrganismos presentes no solo ou que habitam o interior das plantas (endofíticos) são capazes de solubilizar formas insolúveis de P, como o P-Fe. O objetivo foi identificar e avaliar o potencial de bactérias endofíticas e rizobactérias de milho para a solubilização de P-Fe. Vinte e seis isolados bacterianos foram avaliados quanto à sua capacidade de solubilização de P em meio de cultura líquido contendo fosfato de ferro como fonte exclusiva de P, nos tempos de 3, 6 e 9 dias de incubação, a 28°C; 86rpm. A identidade genética dos isolados foi estabelecida com base no sequenciamento parcial do 16S rDNA. O P solúvel foi determinado por um método colorimétrico usando molibdato de amônio. O pH do meio foi aferido após cada intervalo de incubação. Os dados foram submetidos à análise de variância e, quando houve significância ( $p \leq 0,05$ ), as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, (Sisvar 5.6, 5%). A solubilização de P variou significativamente ( $p \leq 0,05$ ) entre os isolados avaliados. Os menores e maiores valores de bioassolubilização 0,34mg P. L<sup>-1</sup> a 231,72mg P. L<sup>-1</sup> foram observados para os isolados B2097 (bactéria não identificada) e B1924 (*Klebsiella pneumoniae*), respectivamente. Os isolados mais eficientes para a solubilização de P-Fe foram as bactérias B1924, B1917 (*Enterobacter*), B1915 e B1923 (*Bacillus pumilus*), B1931, B2008 (*Pantoea ananatis*), B1928 (*Burkholderia gladioli*). As bactérias endofíticas e rizobactérias solubilizadoras de P isoladas nesse estudo representam potenciais candidatas para serem utilizadas em experimentos futuros de campo, visando uma maior absorção de P pela cultura de milho em solos tropicais com altas concentrações de P-Fe.

**Palavras-chave:** 1-Fosfato, 2-Potencial, 3-bioassolubilização, 4-fertilizantes.

**Apoio Financeiro:** Faped, Unifemm, CNPq, Embrapa Milho e Sorgo, Rede Mineira de Endofíticos.



## **RESUMOS**

**Número: 005**

### **POTENCIAL CATABÓLICO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE AQUÍFERO CONTAMINADO COM CREOSOTO PELA TÉCNICA DE ENRIQUECIMENTO CANDIDATAS A INOCULANTES PARA BIORREMEDIADAÇÃO**

Castanon, F.S.<sup>1</sup>; Brito, M. Z.<sup>1</sup>; Santos, V.L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais (Avenida Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte/MG). Email: fscastanon@gmail.com

O creosoto é um óleo formado por diversos compostos com alta toxicidade potencial, representando uma grande ameaça ao meio ambiente. A remediação de ambientes contaminados com este tipo de composto pode ser feita empregando inoculantes bacterianos. Neste contexto, esse trabalho teve como objetivo isolar bactérias candidatas a inoculantes de 8 amostras de aquífero contaminado com creosoto pela técnica de enriquecimento e analisar a alteração da estrutura da comunidade bacteriana durante o processo por PCR-DGGE. As amostras foram submetidas ao processo de enriquecimento em meio mineral mínimo (MM) com 1% de creosoto durante 3 semanas. A cada transferência semanal das células para novo meio, procedeu-se a extração de DNA, PCR de regiões do gene do rRNA e análise por DGGE. Com exceção dos poços PP20 e PP223, o perfil de bandas das outras 6 amostras originais do aquífero foi mais dissimilar comparado às amostras das 3 semanas de enriquecimento, evidenciando que o processo alterou a comunidade bacteriana presente nas amostras originais. Bandas representativas das alterações foram excisadas do gel, sequenciadas e atribuídas aos gêneros *Burkholderia*, *Bordetella*, *Serratia*, *Cupriavidus*, *Delftia*, *Pandoraea* e principalmente *Pseudomonas* após análise no Blast. Ao final, 77 bactérias foram isoladas, identificadas, e caracterizadas quanto à degradação de creosoto e produção de compostos tensoativos em cultivos de 21 dias em meio MM com 0,5% de creosoto. Análises em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas mostraram que o creosoto foi degradado em até 33%, sendo os compostos 2-metiltetracosano, dibenzofurano e fluoreno os mais degradados, com percentuais de até 86,5%, 78,0% e 48,8%, respectivamente. Dentre os isolados, 14 apresentaram atividade emulsificante ( $E_{24}$ ) variando de 55 a 72,5% e redução da tensão superficial do meio para até 37,15 mN/m. Esses resultados evidenciam o potencial desses isolados para uso como inoculantes em processos de biorremediação.

**Palavras-chaves:** creosoto, enriquecimento, DGGE, degradação, CG-EM,  $E_{24}$ , tensão superficial.

**Apoio Financeiro:** Capes e Vale S.A.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 006**

### **ESPECIALIZAÇÃO DE *Escherichia coli* DURANTE PERÍODOS SECOS E ÚMIDOS NA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO GUALAXO DO NORTE APÓS CONTAMINAÇÃO POR REJEITOS DA MINERAÇÃO**

Chagas, I.A.S.<sup>1</sup>; Reis, D.A.<sup>1,2</sup>; Nascimento, L.P.<sup>2</sup>; Ferreira, C.S.<sup>1</sup>; Alves, J.A.<sup>1</sup>; Carvalho, S.V.C.<sup>1</sup>; Assenço, R.<sup>1</sup>; Lanna, M.C.S.<sup>1</sup>; Santiago, A.F<sup>2</sup>; Fongaro, G.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia e Bioprospecção Tecnológica, Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, UFOP, Ouro Preto, MG. <sup>2</sup>Laboratório de Saneamento Ambiental, Departamento de Engenharia Ambiental, Escola de Minas, UFOP, Ouro Preto, MG. E-mail: [igoraparecido07@gmail.com](mailto:igoraparecido07@gmail.com)

A bactéria *Escherichia coli* é um indicador de contaminação fecal, indicando poluição hídrica, lançamento de esgoto doméstico *in natura* ou sem tratamento eficiente nas águas. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi analisar a distribuição espacial da bactéria *Escherichia coli* na bacia hidrográfica do Rio Gualaxo do Norte, o qual foi acometido em 2015 pelo rejeito de minério de ferro oriundo do rompimento da Barragem de Fundão/Samarco. Para isso, 27 estações de coleta ao longo da bacia foram monitoradas quanto a presença e quantificação de *E. coli* em períodos seco e chuvoso/2016. A partir disso, foi gerado um mapa quantitativo dessas concentrações de *E. coli* utilizando o software ArcGIS 10.2®. Ambos os períodos apresentaram altas concentrações de *E. coli*, extrapolando os limites permitidos em legislação vigente, deliberado na Resolução CONAMA 357/2015. Períodos chuvosos apresentaram maior inconformidade com os limites legais, cerca de 70%. A principal fonte poluidora pode ser o lançamento de efluentes domésticos nos corpos d'água, visto que a porcentagem de tratamento de esgoto é muito baixa na bacia hidrográfica. Em função do rompimento da Barragem de Fundão, a lama extrapolada pode ter contribuído no carreamento de material fecal para o Rio Gualaxo do Norte, intensificando sua contaminação. A especialização dos dados permitirá, sobretudo, a gestão para mitigar riscos de doenças em locais estratégicos, minimizando os impactos causados pela contaminação bacteriana e por outros patógenos que a *E. coli* pode co-indicar, como os virais e parasitários, tendo em vista a melhoria de saúde humana, animal e ambiental. Os resultados desta pesquisa, constituíram um estudo sistêmico e atual relativo à bacia hidrográfica do Rio Gualaxo do Norte e, o mais importante, poderão servir de subsídio para a gestão do manancial, a fim de assegurar a sustentabilidade ambiental, econômica e social da região visto a degradação ocorrida.

**Palavras-chave:** *Escherichia coli*, Qualidade das águas, Bacia hidrográfica do Rio Gualaxo do Norte

**Fonte(s) de Financiamento:** CAPES, CNPq, FAPEMIG e Fundação GORCEIX



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 007**

### **CIANOBACTERIAS E MICROALGAS PROVENIENTES DE UMA ÁREA CONTAMINADA COM MERCÚRIO E SUA CAPACIDADE DE METILAÇÃO.**

CARVALHO, P. I. A.<sup>1</sup>; MENDES, L. A. <sup>2</sup>; FRANCO, M. W.<sup>1</sup>; WINDMÖLLER, C. C.<sup>2</sup>; BARBOSA F. A. R.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Limnologia Ecotoxicologia e Ecologia Aquática do Instituto de Ciências Biológicas e INCT-Acqua da Universidade Federal de Minas Gerais; <sup>2</sup>Departamento de Química, Instituto de Ciências exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Brasil. E-mail: paula.iannarelli27@gmail.com

A metilação do mercúrio aumenta a mobilidade desse elemento na cadeia trófica, pois essa espécie química acumula-se mais facilmente nos organismos. Em Descoberto-MG, a contaminação de mercúrio foi devida à atividade de exploração de ouro utilizada pelos ingleses no sec. XIX. Estudos recentes apontam concentrações elevadas de Hg em material retido em tanques de sedimentação de partículas de solo carreadas pela chuva e nos sedimentos da área contaminada em Descoberto. Diante disso, tem-se como objetivos deste estudo: isolar espécies de micro-organismos fitoplanctônicos da área contaminada com Hg; identifica-las por microscopia óptica e testar a hipótese de que cianobactérias e microalgas em cultivo são capazes de metilar mercúrio. Inicialmente amostras de água foram coletadas na área contaminada com Hg, e enriquecidas em meio de cultivo BG-11 líquido suplementado ou não com nitrogênio e mantidas em condições de luz e temperatura controladas. O isolamento foi realizado por meio da micropipetagem e plaqueamento em meio sólido e as culturas obtidas foram mantidas no banco de cultivo do Laboratório de Limnologia, Ecotoxicologia e Ecologia Aquática da UFMG. Foram obtidos 6 isolados: 3 cianobactérias pertencentes ao gênero *Nostoc*, uma do gênero *Chroococcidiopsis*, uma do gênero *Fischerella* e a microalga *Stichococcus bacillaris*. Ensaios de metilação de Hg<sup>2+</sup> foram realizados com culturas de *Fischerella* e *Stichococcus*. As culturas foram expostas ao Hg<sup>2+</sup> por 7 dias e a detecção do CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup> foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a pirólise e detecção por fluorescência de acordo com método validado por Mendes et al., 2016. A cultura de *Stichococcus* mostrou-se capaz de realizar a metilação, indicando sua participação na biotransformação do Hg. É importante ressaltar que a metilação do Hg é geralmente atribuída à atividade de bactérias sulfato-redutoras e este trabalho demonstra que culturas de micro-organismos fitoplanctônicos também participam da biotransformação do Hg.

**Palavras-chave:** Microalga. Mercúrio. Metilação. Contaminação. *Stichococcus bacillaris*.

**Apoio financeiro:** Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Recursos Minerais, Água e Biodiversidade (INCT –Acqua), CAPES, CNPq e FAPEMIG.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 008**

### **AVALIAÇÃO DA SOLUBILIZAÇÃO DE OXIDO DE ZINCO POR BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ISOLADAS DE TOMATEIRO**

Moreno, F. A. R<sup>1</sup>; Reis, M. A.<sup>2</sup>; Silveira, K.C; Baldotto, M. A<sup>3</sup>; Antônio, A. C<sup>3</sup>; Baldotto, L. E. B.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Estudante, de Mestrado em Manejo e Conservação de Ecossistemas Naturais e Agrários da Universidade Federal de Viçosa, Campus Florestal, Rodovia LMG 818, Km 06, CEP 35690-000, Florestal, MG. <sup>2</sup>Estudante, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Viçosa, Avenida Peter Henry Rolfs, CEP 36570-000, Viçosa, MG. <sup>3</sup>Professores, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Viçosa, Campus Florestal, Rodovia LMG 818, Km 06, CEP 35690-000, Florestal, MG.

E-mail: agronomo.moreno@gmail.com

A cultura do tomate é amplamente cultivada no Brasil e no mundo, seu consumo faz parte da dieta diária da maioria da população. Para sua produção é necessário um alto aporte de fertilizantes como fonte de nutrientes. Entretanto novas alternativas vêm sendo estudadas para minimizar os impactos causados pelos fertilizantes nitrogenados, são bactérias promotoras de crescimento de plantas que proporcionam efeitos no crescimento e desenvolvimento das plantas. Dentro dos efeitos mais procurados estão à influência destas no fornecimento de nutrientes e no controle de microrganismos patogênicos. O objetivo do trabalho foi avaliar a solubilização de óxido de zinco por bactérias diazotróficas isoladas de tomateiro. O trabalho foi realizado na UFV-CAF. Total de 29 isolados de bactérias diazotróficas foram avaliados quanto ao potencial de solubilização de óxido de zinco. Os isolados bacterianos foram crescidos em meio líquido DYGS por 24 horas, a 30 °C e 120 rpm. Alíquotas de 10 µL das soluções bacterianas foram colocadas em placas de Petri com meio de cultura sólido contendo: 10 g/L glicose ,1 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,2 g/L KCl, 0,1 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 g/L MgSO<sub>4</sub>, 1 g/L ZnO, 15 g/L agar, em 1 L de água destilada, pH 7 e incubadas a 28 °C por 7 dias. Foram colocados 6 isolados por placa, em três repetições. A avaliação da solubilização de zinco foi feita por meio da obtenção da média das três repetições e o desvio padrão do diâmetro do halo translúcido que se forma em torno das colônias bacterianas solubilizadoras. O diâmetro do halo foi medido com auxílio de um paquímetro digital e calculado por meio da fórmula: diâmetro do halo (mm) = diâmetro total - diâmetro da colônia. Foram identificados 23 isolados com capacidade de solubilizar óxido de zinco. Conclui-se que isolados de bactérias diazotróficas de plantas de tomate também possuem o potencial de solubilização de óxido de zinco o que as potencializa para a promoção do crescimento de plantas.

**Palavras-chave:** *Lycopersicum esculentum* Mill, bactérias fixadoras de nitrogênio, bactérias solubilizadoras de zinco.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 009**

### **EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE CASCA DE CAFÉ COMO SUBSTRATO NA PRODUÇÃO DO COGUMELO DA ESPÉCIE *Pleurotus ostreatus***

CASTRO, C. P<sup>1</sup>; SOUZA J. R<sup>1</sup>; ANTUNES, L. A<sup>1</sup>; MORAES, T.S. J<sup>1</sup>; VILELA, L; DIAS<sup>1</sup>, E.S; ZIED, D.C<sup>1</sup>.

Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG (Av. Doutor Sylvio Menicucci, 1001 - Kennedy, Lavras - MG, Brasil..

A produção de café é uma atividade de grande importância no Brasil e faz com que o país se destaque mundialmente neste setor. A industrialização deste produto gera a casca de café, considerada um resíduo sólido que pode poluir o meio ambiente se não tratada de forma devida. O uso deste material pode ser utilizado como substrato para a produção de cogumelos comestíveis do gênero *Pleurotrus*, já que este fungo possui capacidade lignocelulolítica característica. O objetivo deste trabalho foi o de avaliar a utilização da casca de café em diferentes proporções para a produção de *Pleurotrus ostreatus*. No preparo dos substratos, foram utilizados bagaço de cana e casca de café nas proporções de 25% casca de café + 75% bagaço de cana; 50% casca de café + 50% bagaço de cana; 75% casca de café + 25% bagaço de cana e 100% casca de café. Os blocos foram autoclavados a 4h por 121°C e inoculados com a matriz secundária de *Pleurotrus ostreatus* em capela de fluxo contínuo. Foram feitos 8 blocos de 1800 g de cada tratamento, totalizando 32 blocos nos quais foram dispostos de forma casualizada em sala de cultivo monitorada com temperatura ±26°C e umidade acima de 70%. Os cogumelos foram colhidos durante os 40 dias após a inoculação e foi realizado o cálculo de produtividade levando em consideração o peso do cogumelo fresco em relação ao peso do substrato fresco. A produtividade no substrato com 100% de casca de café não foi observada, o que pode ser devido a falta de aeração do material. Já nos tratamentos com 25%, 50% e 75% os valores mostraram-se semelhantes estatisticamente a nível de 5 % de probabilidade de acordo com o teste de Tukey, obtendo uma produção média de 8,4% em todos as proporções. A utilização da casca de café mostrou-se eficaz nas três proporções, pois a maior concentração deste material comparada com a mínima foi semelhante. Isso indica que a casca de café pode ser incluída em até 75% na composição do substrato, favorecendo um maior aproveitamento deste resíduo.

**Palavras-chave:** *Pleurotrus ostreatus*, casca de café, substrato, produtividade.

**Agência Financiadora:** FAPEMIG



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 010**

### **DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS FOLIARES DE SERINGUEIRA (*Hevea brasiliensis*) NATIVAS DA AMAZÔNIA ORIENTAL BRASILEIRA**

Cunha,M.C.<sup>1</sup>; Silva,A.C.<sup>1</sup>; Tomé, L.M.R<sup>1</sup>, Fonseca,P.L.C.<sup>1</sup>; Góes-Neto, A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>. Laboratório de Biologia Molecular e Computacional de Fungos, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. <sup>3</sup>, Belo Horizonte, MG.

**Email:** [mayaracabral@ufmg.br](mailto:mayaracabral@ufmg.br)

Fungos endofíticos são aqueles capazes de colonizar tecidos vegetais por pelo menos um período do seu ciclo biológico sem provocar nenhuma alteração sintomática à planta hospedeira. Vários estudos demonstraram que fungos endofíticos influenciam na adaptabilidade do hospedeiro. Uma planta cuja diversidade de endofíticos é pouco estudada é a seringueira, (*Hevea brasiliensis*) espécie mais produtiva de látex natural, com elevada variabilidade genética, e o seu látex apresenta maior maleabilidade, maior resistência ao impacto, entre outras propriedades. Sendo assim, o presente estudo tem como objetivo caracterizar a comunidade fúngica associada às folhas de seringueira de indivíduos de *H. brasiliensis* em duas unidades de conservação da Amazônia brasileira: Parque Nacional de Anavilhanas (AM-BR) e Floresta Nacional de Caxiuanã (PA-BR). Foram coletados quatro indivíduos de seringueira de Anavilhanas e cinco indivíduos na Floresta Nacional de Caxiuanã. Para a identificação dos fungos isolados, foi feita a extração de DNA, amplificação da região ITS (código de barras de DNA), revelando um total de 16 gêneros distintos de fungos endofíticos. Foi observado que independente da área de coleta, o filo de maior frequência foi o Ascomycota e os gêneros mais abundantes foram *Colletotrichum* sp., *Bionectria* sp. e *Trichoderma* sp. Em ambas as regiões de estudo a abundância de fungos isolados foi semelhante. No total foram obtidos 266 isolados de fungos endofíticos provenientes de nove indivíduos de seringueira e nestes foi realizada a avaliação do "hipótese de espécies" (SH) para os taxa descobertos em agrupamento em diferentes limiares de similaridade (97-99%). Essas sequências de referência são retiradas do UNITE e realizam pesquisas de similaridade local e no pipeline. A partir dos estudos de diversidade da comunidade fúngica, podem ser explorados isolados que possuem atividade antifúngica contra o maior fitopatógeno de seringueira (*Pseudocercospora ulei*).

**Palavras-chave:** Fungos endofíticos, *Hevea brasiliensis*, diversidade, códigos de barras de DNA

**Apoio Financeiro:** NSF, CAPES, CNPq



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 011**

### **AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ADIÇÃO DE LEITO FIXO DE CARVÃO NA MANUTENÇÃO DO pH E REMOÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA EM BIODIGESTORES ANAERÓBIOS**

Júnior, A. C. S.<sup>1</sup>; Alves, D. C.<sup>1</sup>; Melo, B. R.<sup>1</sup>; Júnior, A. C. S. <sup>1</sup>; Piazzai, A.C.F.<sup>1</sup>; Silva, J.M<sup>1</sup>; Araújo, K.C.<sup>1</sup>; Oliveira Júnior, E. N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório Biotecnológico, Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos, Campus Alto Paraopeba, UFSJ, Ouro Branco, MG.

E-mail: [eniobio@ufsj.edu.br](mailto:eniobio@ufsj.edu.br)

Biodigestores anaeróbios são sistemas que aliam tratamento de efluentes à produção de energia na forma de biogás. No entanto, seu uso é limitado pelo alto teor de matéria orgânica residual e, em alguns casos, pela acidificação do reator, comprometendo a atividade metanogênica. A utilização de leito fixo em biodigestores tem melhorado seu desempenho. Neste trabalho avaliou-se o efeito da adição de leito fixo de carvão na manutenção do pH e remoção da matéria orgânica em biodigestores anaeróbios. Utilizou-se carvão ativado de ossos bovinos, o qual foi caracterizado por meio de MEV/EDS. O carvão foi utilizado como leito em frasco de anaerobiose contendo soro de queijo como substrato e dejetos bovinos como inóculo. Também foi preparado um frasco controle, sem a presença do carvão, com o intuito de avaliar a eficiência do leito. Os frascos foram incubados por 24 dias com acompanhamento do pH e, ao final do experimento, remoção da demanda química de oxigênio (DQO). O frasco contendo carvão e o controle apresentaram pH final de 5,68 e 3,74, respectivamente. A remoção de DQO foi de 96,8% para o carvão e de 48,7% para o controle. As micrografias do leito indicaram elevada porosidade e superfície irregular. Além disso, de acordo com o MEV, foi possível identificar elevados teores de Ca (43,2%), O (39,6%) e P (16,0%), como esperado devido a hidroxiapatita,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , ser o componente majoritário dos ossos bovinos. Percebe-se então que o carvão agiu como um tamponante favorecendo a biodigestão, uma vez que os microrganismos metanogênicos são sensíveis ao baixo pH. Os resultados de remoção de DQO evidenciam que a presença do leito fixo favorece a remoção da matéria orgânica. Isso pode ser devido à adsorção do substrato com dessorção gradual, o que otimiza o tratamento do efluente com alta carga fermentescível evitando acidificação. Deste modo, este trabalho sugere que o leito de carvão equilibra o pH da biodigestão e aumenta a remoção de matéria orgânica.

**Palavras chave:** Biodigestão, Soro de leite, Carvão ativado, Tratamento de efluentes.

**Apoio financeiro:** FAPEMIG e FNDE



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 012**

### **METAGENOMICS AND REAL-TIME PCR REVEAL THE DANGER OF BACTERIA AND VIRUS COMMUNITIES AT THE MAIN AIRPORT AND CENTRAL BUS STATION OF BELO HORIZONTE, BRAZIL**

LEAL BERNARDES A. F.<sup>1,2</sup>; OLIVEIRA, A. G. G.<sup>2</sup>; FONGARO, G.<sup>3</sup>; LANNA, M. C. S.<sup>3</sup>; NASCIMENTO, A. M. A<sup>2</sup>; FRANÇA DIAS, M.<sup>2</sup>; MARQUIOLI, D. D. F.<sup>2</sup>; FREITAS, D. L.<sup>1</sup>, MAGALHÃES, P. P.<sup>2</sup>; FARIAS, L. M.<sup>2</sup>

**1**- FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS, BELO HORIZONTE, MG. **2**- UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, MG. **3**- Universidade FEDERAL DE OURO PRETO, MG. E-mail: andre.leal@funed.mg.gov.br

The One Health Concept encompasses an interdisciplinary network of knowledge focused on the control the spread of infectious diseases. In this context, environmental health provides crucial information and plays an important role in preventive health. The increased movement of people between different geographical areas is receiving special attention, since microorganisms which are colonizing travelers may be inserted into the visited environments. For example, when using public toilets some of these microorganisms may be excreted. Airports and bus stations are particularly favorable environments for this dispersion. Metagenomics and qPCR are tools frequently used in the study of environmental microbial diversity and research of potential pathogens. Thus, it seemed opportune to employ these approaches to investigate the microbial diversity of sanitary sewers of Pampulha Airport and BH Bus Terminal, public environments with a high concentration of people from different locations. In 2016, samples of sanitary sewage from the mentioned places were collected in two moments, with normal circulation of people and in period of increased movement. The samples were submitted to DNA and RNA extraction for enteric virus (total enteroviruses, adenovirus, rotavirus and hepatitis A and E viruses), Bacteria and Archaea. All enteric viruses studied were detected in at least one of the samples obtained at the airport and at the bus station. The Bacteria domain was observed with far superior abundance compared to the Archaea domain. Firmicutes phylum was the most abundant, showing a higher relative frequency on days of intense movement of people. *Aeromonas* and *Arcobacter*, relevant potential pathogens, were found in all samples studied. Environmental monitoring actions associated to the “One Health” context would help to prevent infectious diseases and constitute an important tool to subsidize public policy actions aimed at the protection, promotion, and recovery of collective health.

**Keywords:** metagenomics, qPCR, sanitary sewage, enteric virus, microbial diversity.

**Apoio Financeiro:** CNPq, CAPES, FAPEMIG e PRPq/UFMG.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 013**

### **AVALIAÇÃO DA AÇÃO INSETICIDA DE FUNGOS ASSOCIADOS À MAHANARVA SPECTABILIS (DISTANT, 1909) (HEMIPTERA: CERCOPIDAE) EM SISTEMA SILVIPASTORIL NA AMAZÔNIA**

Campagnani, M. O.<sup>1</sup>; Campos, W. G<sup>1</sup>; Amorim, S. S.<sup>2</sup>; Rosa, L.H.<sup>2</sup>; Auad, A.M<sup>3</sup>; Cangussú, M. A.<sup>4</sup>; Maurício, R. M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Engenharia de Biossistemas (DEPEB), Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ). São João del-Rei, MG. <sup>2</sup>Laboratório de Sistemática de Biomoléculas de Fungos, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Belo Horizonte, MG. <sup>3</sup>Laboratório de Entomologia, Embrapa Gado de leite (CNPGL), Juiz de Fora, MG, <sup>4</sup>Centro Brasileiro de Pecuária Sustentável (CBPS), Imperatriz, MA, Brasil, E-mail: mcampagnani@gmail.com;

Pressupõe-se que ecossistemas tropicais de alta biodiversidade de fauna e flora sejam reservatórios de novos fungos entomopatogênicos com potencial para ampliar o papel do controle biológico na agropecuária. De fato, a presença de *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) (Hemiptera: Cercopidae) atacada por fungos tem sido evidenciada em Sistemas Silvipastoris (SSPs) implantado em área de Cerrado brasileiro onde esta praga tem sido naturalmente controlada. Este fato promove a hipótese de que fungos entomopatogênicos estão envolvidos no controle dessas populações de cigarrinhas-das-pastagens. O presente estudo é uma prospecção de fungos naturalmente associados a *M. spectabilis*, por meio da avaliação de sua virulência. Foram coletadas cigarrinhas infectadas em um SSP no estado do Maranhão, das quais cinco espécies de fungos foram isolados e identificados por análises morfológicas e moleculares. Os conídeos de cada um dos cinco fungos silvestres e de uma cepa comercial de *M. anisopliae* foram diluídos em suspensão salina (1% NaCl) nas concentrações de  $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^6$ ,  $10^8$ ,  $10^{10}$  e  $10^0$  (controle). As seis suspensões foram aplicadas em estágios imaturos de *G. mellonella*. Formaram-se trinta e seis tratamentos com quatro repetições (6 fungos x 6 concentrações x 4). Em laboratório, os hospedeiros foram inoculados e mantidos em caixas de acrílico no interior de câmara BOD a 25°C. Os fungos mais virulentos foram codificados como UFMG 11443 e 11444, ambos causando mortalidade de mais de 90% das lagartas de *G. mellonella*. Os demais fungos UFMG 11440, 11441 e 11442, foram tão ou mais eficientes que a cepa comercial de *M. anisopliae*, sempre com capacidade de infectar as lagartas superior a 50%, após 48h de aplicação. Todos os fungos isolados demonstraram potencial para atuar como agentes de controle biológico.

**Palavras chave:** fungos entomopatogênicos, *metarhizium*, controle biológico.

**Apoio financeiro:** CAPES, PVE-CAPES, CNPq, PPM-FAPEMIG



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 014**

**FUNGOS EXTREMÓFILOS DE SEDIMENTOS MARINHOS DA ANTÁRTICA**

Priscila Silveira Corrêa<sup>1</sup>, Juliana Aparecida dos Santos<sup>1</sup>, Lara Durães Sette<sup>1</sup>,

<sup>1</sup>Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita – UNESP Campus Rio Claro.

Os micro-organismos que habitam os ecossistemas Antárticos são adaptados às condições extremas desses ambientes (e.g. baixas temperaturas, alta incidência de radiação UV, baixa disponibilidade de água e nutrientes), justificando a importância do conhecimento dessas espécies microbianas. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo isolar e preservar fungos filamentosos e leveduras que habitam sedimentos marinhos da Antártica. As amostras utilizadas neste trabalho foram coletadas em 7 pontos diferentes da Baía do Almirantado, Ilha Rei George (Antártica). Para o isolamento, foi realizado enriquecimento das amostras em meio de cultivo Potato Dextrose Broth (PDB) preparado com água do mar artificial (incubação a 15°C por 10 dias a 150 rpm). Em seguida, alíquotas de 200 µL das diluições 10<sup>-1</sup> e 10<sup>-3</sup> foram transferidas para placas de Petri contendo dois meios de cultivo distintos (PDA 10% e 100%) e incubadas a 15°C. Os resultados obtidos mostraram que foi possível a recuperação de 41 fungos filamentosos e 26 leveduras. De acordo com o meio de cultivo utilizado, 58,5% dos fungos filamentosos recuperados cresceram em meio PDA 100% e 76,9% das leveduras foram isoladas em meio PDA 10%. Cerca de 78% dos fungos filamentos foram recuperados do sedimento coletado em Punta Ullman e 49,4% das leveduras foram obtidas do sedimento coletado em Botany Point. Em adição, 58% dos fungos filamentosos apresentaram a formação de pigmentos avermelhados. Esse pode ser um mecanismo utilizado pelo fungo como proteção aos raios UV. Os fungos filamentosos e leveduras foram preservados utilizando o método criopreservação a -80°C em glicerol 10%. O método de Castellani foi também aplicado para os fungos filamentosos. Os estudos de micro-organismos de amostras de sedimentos marinhos antárticos podem levar à descoberta de novas espécies e de compostos de aplicação em diversos setores de importância econômica, além de proporcionar uma maior compreensão da biodiversidade nesse ambiente.

**Palavras-chave:** *Micologia, extremófilos, sedimentos marinhos.*

**Financiamento:** CNPq, FAPESP.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 015**

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E SEQUENCIAMENTO GENÔMICO DE UM VACCINIA VIRUS SILVESTRE - SPANV(SPAN232)**

Amaral, M. N.<sup>1</sup>; Leão, T. L.<sup>1</sup>e da Fonseca, F. G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Virologia Básica e Aplicada, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG. E-mail: maisabioufmg@gmail.com

O vírus SPAn232 (SPAnV) foi isolado em 1961 de camundongos na floresta de Cotia, no interior de São Paulo. O SPAnV, devido a uma reação sorológica cruzada foi inicialmente considerado uma amostra do vírus Cotia (CV), um outro poxvírus também isolado no Brasil na mesma época. A amostra adquirida pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Vírus da Universidade Federal de Minas Gerais (LVBA), apesar de rotulada como uma amostra de Cotia vírus apresentou, após primeiros experimentos, notáveis diferenças do isolado de CV descrito originalmente, apresentando ampla similaridade com membros da espécie *Vaccinia virus*. Este trabalho está sendo desenvolvido com a finalidade de caracterização biológica e sequenciamento total do genoma da amostra SPAn232, anteriormente descrita como CV, mas que ainda se encontra como um agente desconhecido. Análises morfológicas e moleculares podem também ajudar e inferir sobre sua classificação taxonômica. Esta caracterização consiste em observar o comportamento desse vírus quanto ao fenótipo de placa de lise, avaliação da multiplicação viral e crescimento em cultura de células BSC40 além da seleção clonal seguida de sequenciamento total do genoma. A curva de crescimento do vírus alcançou rendimento máximo em cerca de 12 a 24 h apresentando indução de efeito citopático detectável em cerca de 6h após infecção, com aparecimento de placa viral após 12h. A sequência completa do genoma de SPAn232 ainda está sendo determinada, e, portanto, seu resultado não faz parte do escopo deste texto. Os resultados já obtidos confirmam que SPAn232 faz parte da família *Poxviridae* pertencente ao gênero *Orthopoxvirus*, hipótese essa devido as semelhanças apresentadas com membros deste grupo.

**Palavras chave:** *Vaccinia vírus; caracterização viral, sequenciamento genômico, multiplicação viral.*

**Apoio financeiro:** CNPq, CAPES e FAPEMIG



## **RESUMOS**

**Número: 016**

### **THE INVESTIGATION OF PROMOTER SEQUENCES OF MARSEILLE VIRUSES HIGHLIGHTS A REMARKABLE POTENTIAL FOR GENE ACQUISITION AND GENOME EXPANSION**

Graziele Pereira Oliveira<sup>1</sup>, Maurício Teixeira Lima<sup>1</sup>, Thalita Souza Arantes<sup>1</sup>, Felipe Lopes Assis<sup>1</sup>, Rodrigo Araújo Lima Rodrigues<sup>1</sup>, Flávio Guimarães da Fonseca<sup>1</sup>, Cláudio Antônio Bonjardim<sup>1</sup>, Erna Geessien Kroon<sup>1</sup>, Philippe Colson<sup>2</sup>, Bernard La Scola<sup>2</sup>, Jônatas Santos Abrahão<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; <sup>2</sup> URMITE, Aix Marseille Université, UM63, CNRS 7278, IRD 198, INSERM 1095, IHU - Méditerranée Infection, AP-HM, 19-21 boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille, France. E-mail:[graziufmg@yahoo.com.br](mailto:graziufmg@yahoo.com.br)

Promoter motifs have been elucidated for some nucleocytoplasmic large DNA viruses among them *Marseilleviridae* is a well-recognized family because of its genomic mosaicism. The marseillevirus (MsV) have an ability to incorporate foreign genes, especially from sympatric organisms inhabiting *Acanthamoeba*. To investigate the promoter motif of marseilleviruses, its intergenic region (IR) were obtained. The distance between the promoter and the ATG initiation codon was calculated and the IR origins were performed. To understand the biological relevance of the AAATATT sequence in the gene expression, plasmids contained the AAATATT sequence and progressive variations of this sequence were used to transfect *Acanthamoeba castellanii* cells infected with MsV and the analyses was performed by RNAm transcripts of the GFP and by fluorescence microscope analyses. Here, we describe for the first time the identification of an octamer promoter motif — AAATATT — that controls 55,1% of MsV genes and is conserved in all marseilleviruses lineages, more than any giant virus described to date. The analysis reveals that the AAATATT motifs are located mainly at -1 to -100bp upstream of ATG. The biological assays confirmed the importance of the motif in MsV gene expression since *Acanthamoeba castellanii* cells infected with MsV and transfected with plasmids containing the promoter motif (AAATATT) showed high expression of GFP and negative effect on gene transcription was detected for all mutant versions of this motif. We results also suggested that marseilleviruses IRs are of an independent origin that is unrelated to respective donor organisms since were not found in MsV IRs that are similar to other organisms. Finally, multiple copies of available AAATATT promoter motifs homogeneously distributed within the IRs that are not controlling a downstream gene may explain why the marseilleviruses have the ability to acquire foreign genes that contribute to its fitness and genome expansion.

**Keywords:** *Marseilleviridae*, promoter, gene expression, lateral gene transfer

**Financial Support:** CNPq, Fapemig, Capes.



## RESUMOS

Número: 017

### GENOMIC AND MICROSCOPICAL CHARACTERIZATION OF BORELYVIRUS: A NEW GIANT VIRUS ISOLATED FROM SERRA DO CIPÓ NATIONAL PARK, MINAS GERAIS

Silva, L. K. S.; Andrade, A. C. S. P.; Hiroyuki, H.; Andreani, J.; Levasseur, A.; Abrahão, J.S.; La Scola, B.

Over the last decade, new members of the family *Mimiviridae* were isolated from a large variety of samples and regions. Currently our research group has been devoting efforts to discover and describe novel giant viruses from different sources. Recently, a new-found member of the genus *Mimivirus*, named Borelyvirus, was prospected by our group using amoeba-associated virus co-culture from a sample collected in a small river located in the Serra do Cipó National Park, Minas Gerais. After this discovery, Borelyvirus was submitted to transmission electron microscopy (TEM) analyses, biological assays and complete genome sequencing using the Illumina MiSeq instrument (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) with the paired end application. The DNA polymerase, RNA helicase and major capsid protein genes were used for phylogenetic analysis. The morphologic observation by TEM revealed icosahedral particle viruses with approximately 400 nm covered by an unusual less dense fibril layer when compared to other mimiviruses. The sequencing analysis showed that the genome of Borelyvirus has 1.038.187 bp of size. Its genome presented a low C+G% content (25.2%), similar to other mimiviruses. Furthermore, the genome of Borelyvirus encodes five tRNA molecules: three tRNA-Leu, one tRNA-His and one tRNA-Cys. The gene prediction showed that the genome encodes a total of 1005 ORFs, and among this 7 were considered ORFans. Moreover, 45 sequences, also without any predicted function, presented less than 100 aa and were characterized as pseudo-ORFs. The functional annotation showed putative proteins related to several metabolic processes, nucleic acid binding and manipulation. Finally, for the ORFs predicted, the best hits were most frequently proteins from mimivirus lineage B (87.86%). Corroborating these results, the phylogenetic analysis of different genes also clustered the Borelyvirus with other members of lineage B, including moumouvirus-like strains.

**Key words:** mimivirus, genomic characterization, microscopical characterization.

**Financial Support:** CNPq, CAPES, FAPEMIG, PPG-Microbiologia UFMG.



## **ÁREA: BIOTECNOLOGIA**

**Número: 018**

### **OS EFEITOS PROTETORES DE *Lactobacillus Delbrueckii* UFV-H2b20 EM MODELO EXPERIMENTAL DE ASPERGILOSE PULMONAR**

Oliveira-Malacco, N.L.S.<sup>1</sup>; Montuori-Andrade, A.C.M<sup>1</sup>; Nolasco, A.E.S. <sup>1</sup>; Vieira, L.Q<sup>1</sup>; Santos, L.M. <sup>1</sup>; Teixeira, M.M. <sup>1</sup>; Soriani, F.M. <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

A bactéria *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 é um probiótico capaz de estimular e modular o sistema imunológico do hospedeiro tanto dentro como fora do trato gastrointestinal, como demonstrado em trabalhos que apontaram seu efeito protetor durante infecções por *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi investigar o efeito de *L. delbrueckii* UFV-H2b20 na resposta inata em um modelo de pneumonia fúngica causada pelo *Aspergillus fumigatus*. Camundongos BALB/c, com 10 semanas, receberam  $10^9$  células de *L. delbrueckii* diariamente por gavagem de 10 dias antes da infecção até o dia da eutanásia. O grupo controle recebeu salina. Após o tratamento, os animais foram infectados por via intranasal com  $3 \times 10^8$  conídios de *A. fumigatus* e eutanasiados 24 horas após a infecção. Foram coletados o lavado broncoalveolar e pulmões. Os resultados mostram que, após infecção, os animais tratados com *L. delbrueckii* apresentam um atraso na mortalidade associado a uma menor perda de peso corpóreo em comparação ao grupo não tratado. Além disso, os camundongos tratados com *L. delbrueckii* possuem menor carga fúngica nos pulmões, quando comparados ao grupo controle. Em relação às células recrutadas para o sítio infectoso, foi observada uma redução significativa na quantidade de leucócitos totais, de neutrófilos e também de extravasamento de proteínas plasmáticas nos camundongos tratados com *L. delbrueckii* em comparação aos camundongos não tratados. Já em relação ao perfil de recrutamento células após infecção, foi observado que os níveis de CXCL1 e TNF foram semelhantes entre os grupos, no entanto, as citocinas IL-1 $\beta$ , IL-17 e IL-10 apresentaram níveis menores no grupo tratado com *L. delbrueckii*. Em conjunto, os resultados mostram que o probiótico *L. delbrueckii* atua na regulação da resposta imune inata e na redução da inflamação causada pela aspergilose pulmonar, o que culmina na redução da perda de peso corpóreo e menor mortalidade associada à doença.

**Palavras chave:** Probiótico, microbiota, bactérias lácticas, infecção pulmonar, aspergilose.  
**Apoio Financeiro:** CAPES, CNPq, FAPEMIG.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 019**

### **NOVOS COMPOSTOS BENZOILGUANIDÍNICOS COM POTENCIAL INIBITÓRIO PARA DESOXI-HIPUSINA SINTASE HUMANA**

Fernandes-Silva, S.<sup>1</sup>, Eguiluz, A. D. B.<sup>1</sup>, Barbosa, N. M.<sup>1</sup>, González, E. R. P.<sup>2</sup>, Zanelli, C. F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Microrganismos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, SP. <sup>2</sup>Laboratório de Química Orgânica Fina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Presidente Prudente, SP. E-mail:[suelenfernandesilva@gmail.com](mailto:suelenfernandesilva@gmail.com)

A enzima desoxi-hipusina sintase (DHPS) atua na primeira etapa da formação do aminoácido hipusina, mediante modificação pós-traducional da proteína eIF5A. DHPS é apontada como um alvo promissor para o desenvolvimento terapias, principalmente para desordens de proliferação celular e processos inflamatórios. Este trabalho tem como finalidade avaliar o potencial de inibição da DHPS humana de novos compostos benzoilguanidínicos (genericamente chamados de GNO<sub>2</sub>Bz, GBrBz, GAnBz, GTolBz, GtbuBz, GIBz, GMetBz e GFBz) e as suas respectivas citotoxicidades em cultura de célula de mamífero. Para o teste de inibição *in vitro*, DHPS recombinante foi produzida em *E. coli* BL21 co-expressando o complexo de chaperona groES-groEL e purificada utilizando Ni-NTA (Qiagen). A porcentagem de inibição da DHPS usando os compostos a 500 μM foi analisada indiretamente através da detecção da intensidade de fluorescência do acúmulo de NADH na primeira etapa da reação intermediada pela DHPS. A citotoxicidade celular foi medida com o ensaio MTT em linhagem murina de macrófagos RAW264.7 e foram determinadas as concentrações inibitórias de 50% da viabilidade celular (IC50). Os compostos apresentaram os seguintes valores de porcentagem de inibição e de IC50, respectivamente: 22,68% e 621,70 μM (GNO<sub>2</sub>Bz); 80,06% e 563 μM (GBrBz); 11,94% e 398,91 μM (GAnBz); 19,40% e 532,02 μM (GTolBz); 27,98% e 603,21 μM (GtbuBz); 86,61% e 1013,25 μM (GIBz); 78,42% e 1362,87 μM (GMetBz); 87,41% e 891,48 μM (GFBz). GIBz, GMetBz e GFBz apresentaram resultados mais promissores, devido a menor citotoxicidade em macrófagos e a maior inibição da DHPS nessa concentração. O estudo de moléculas capazes de interagir com a DHPS poderá levar ao desenvolvimento de novos inibidores que poderão, futuramente, serem agentes antiproliferativos e anti-inflamatórios.

**Palavras chave:** Desoxi-hipusina sintase, eIF5A, DHPS, GC7, inibição enzimática.

**Apoio Financeiro:** CAPES e FAPESP



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 020**

**PERFIL DE CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS ÁCIDO ACÉTICAS E LEVEDURAS EM KOMBUCHA DE CHÁ PRETO**

Santos, W.C.R.<sup>1</sup>, Barbosa, C.D.<sup>1</sup>, Lacerda, I.A.C<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: wildonestudos@gmail.com

A Kombucha é uma bebida adocicada, refrescante e levemente ácida, produzida a partir da fermentação da infusão de *Camellia sinensis* por ação conjunta de bactérias ácido acéticas (BAC) e leveduras. A composição microbiana do inóculo varia de acordo com a origem e região geográfica. Na literatura existem relatos associando a bebida com propriedades de interesse terapêutico e medicinal no controle e prevenção de doenças, além do incremento de funções metabólicas. Objetivou-se analisar o perfil de crescimento de BAC e leveduras durante a fermentação de kombucha de chá preto. Preparou-se uma infusão de 1,5% de chá preto (1,5L de água mineral e 10% de sacarose), após resfriada adicionou-se 15% de inóculo convencional (sendo 10% da parte líquida e 5% da matriz celulósica). O preparado foi colocado em frascos estéreis em triplicata e protegidos por um tecido de algodão, sendo incubados em temperatura ambiente por 20 dias. Durante a fermentação realizou-se amostragem em 0, 3, 7, 10, 15 e 20 dias. Alíquotas (0,1mL) dos diferentes tempos foram plaqueados em 10 meios de cultivos, sendo: isolamento e purificação (MYP, Suomalainem, GYC, RAE, AE e YM) e diferenciais (Carr e DSM) ambos para enumeração de bactérias ácido acéticas; GYMP e Sabouraud (0,05% de cloranfenicol) foram utilizados para leveduras. Todos os meios utilizados apresentaram altas contagens e uniformidade no padrão de crescimento. As contagens de BAC e leveduras revelaram populações iniciais de  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>, um pico de crescimento próximo ao 15º dia com populações acima  $10^7$  (BAC) e  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> (leveduras) e discreto declínio até 20º dia analisado, com populações finais próximas à  $10^6$  (BAC) e  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> (leveduras). Durante a fermentação de kombucha de chá preto foi possível evidenciar que o crescimento de BAC e leveduras ocorre de maneira semelhante, sendo as BAC ligeiramente presentes em maior contagem.

**Palavras chave:** bactérias ácido acéticas, leveduras, kombucha



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 021**

**JOGANDO COM OS MICRÓBIOS: EXATAMENTE MICROBIOLOGIA**

Soares, L. F. A.<sup>1</sup>; Turbino, V. F. G.<sup>1</sup>; Rizzon, S. H. S.<sup>2</sup>; Santos, L. E. S.<sup>3</sup>; Santos, D. S.<sup>4</sup>; Santos, D. S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde do Centro Universitário de Belo Horizonte - UNIBH. Belo Horizonte, MG; <sup>2</sup>Instituto de Engenharia e Tecnologia do UNIBH; <sup>3</sup>Faculdade de Análise e Desenvolvimento de Sistemas - Faculdade Visconde de Cairu. Salvador- BA; <sup>4</sup>Docente em regime TI da Universidade Salvador – UNIFACS. Salvador, BA. E-mail: [leticiafsoares@outlook.com](mailto:leticiafsoares@outlook.com)

A gameficação é uma estratégia de metodologia ativa que permite ministrar conteúdos acadêmicos usando elementos de jogos, fora do mundo dos jogos. Essa abordagem visa promover o empoderamento dos alunos no processo de ensino-aprendizagem com criatividade, diversão e alguns recursos tecnológicos. O objetivo deste trabalho foi a construção de um aplicativo de jogo do tipo *quiz* com conteúdo de microbiologia. Para tanto, dez temas importantes da microbiologia foram escolhidos e sobre estes foi criado um banco de questões (33 por tema) e imagens, para serem inseridos no aplicativo. As questões eram do tipo múltipla escolha com 5 alternativas. As ilustrações foram obtidas no laboratório de microbiologia do UNIBH entre maio de 2015 e julho de 2017 usando técnicas de microscopia, de coloração e de cultivo. O resultado desse trabalho foi o “EXATAMENTE MICROBIOLOGIA”, um aplicativo de jogo voltado para o ensino de microbiologia no nível superior. Ele pode ser acessado *online* e consiste em um desafio interativo através de perguntas e respostas, começando de forma simples e evoluindo através dos níveis. O jogo possui funcionalidades que aumentam a interatividade como item de dicas (mochila) e elementos sonoros. Os participantes são classificados conforme a pontuação e podem ter interação social dentro do jogo. A competitividade associada ao jogo aumenta a adesão e utilização, permitindo que os alunos aprendam conceitos importantes da microbiologia, como aqueles usados em diagnóstico e tratamento de doenças infecciosas, em processos biotecnológicos e em manejo animal e ambiental, enquanto praticam o jogo.

**Palavras-chave:** Serious games; Metodologia ativa; gamificação.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 022**

### **AVALIAÇÃO DO EFEITO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO NO DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS DE MILHO EM HIDROPONIA**

Andrade, D.L.<sup>1</sup>; Carvalho, C.<sup>1</sup>; Palhares, V.<sup>2</sup>; Oliveira, N.T.<sup>2</sup>; Marriel, I.E.<sup>1,2,3</sup>; Oliveira, C.A.<sup>1,3</sup>; Pastina, M.M.<sup>3</sup>; Gomes, E.A.<sup>3</sup>; Lana, U.G.P<sup>1,3</sup>, de Sousa, S.M.<sup>1,2,3</sup>.

<sup>1</sup>Centro Universitário de Sete Lagoas; <sup>2</sup>Universidade Federal de São João del-Rei; <sup>3</sup>Embrapa Milho e Sorgo.  
E-mail: dlandrade2004@yahoo.com.br.

A utilização dos bioestimulantes microbianos são alternativas atraentes e viáveis para a redução de insumos químicos, contribuindo para sustentabilidade agrícola. Os inoculantes microbianos incluem principalmente bactérias de vida livre e fungos micorrízicos que podem ser aplicados em sementes, superfícies de plantas ou solo, e promover o crescimento por diversos mecanismos. Este trabalho teve como objetivo investigar, utilizando um sistema hidropônico, o efeito de microrganismos no crescimento de plântulas de milho. Foram utilizadas oito cepas dos gêneros *Bacillus* e *Azospirillum* pertencentes à coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos da Embrapa Milho e Sorgo que foram crescidas em meio LB, centrifugadas e ressuspendidas em solução salina na concentração de  $10^5$  a  $10^8$  unidades formadoras de colônias (cfu)/mL para inoculação das plântulas. As sementes de milho foram germinadas por quatro dias e crescidas em um sistema *floating* durante sete dias com a solução nutritiva  $\frac{1}{2}$  Hoagland. Após o período de aclimatação, as raízes de milho foram incubadas com o inóculo microbiano durante seis horas e transferidas para a solução nutritiva por mais dez dias. As raízes do milho foram fotografadas e as características radiculares quantificadas com os softwares RootReader2D e WinRhizo. A raiz e a parte aérea foram secas a 65 °C até adquirirem peso constante. Seis tratamentos aumentaram o peso seco total e três aumentaram a área total da superfície radicular. Por meio da análise de componentes principais foi possível observar a distribuição das cepas em três grupos com valores de peso seco e morfologia radicular superiores, iguais ou inferiores ao controle sem inoculação. Nossos resultados mostraram efeitos positivos na morfologia da raiz e peso seco de plântulas de milho, indicando potenciais cepas microbianas para serem utilizadas como inoculantes.

**Palavras-chave:** Microrganismos biostimulantes, *Zea mays*, *Bacillus*, *Azospirillum*.

**Apoio financeiro:** EMBRAPA, CNPq e FAPEMIG



## RESUMOS

Número: 023

### PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS CULTIVÁVEIS DE CAMPOS FERRUGINOSOS: NOVAS POSSIBILIDADES BIOTECNOLÓGICAS A PARTIR DE UM ESTUDO PILOTO.

Washington Luiz Caneschi<sup>1</sup>, Érica Barbosa Felestrino<sup>1</sup>, Renata de Almeida Barbosa Assis<sup>1</sup>, Camila Gracyelle de Carvalho Lemes<sup>1</sup>, Isabella Ferreira Cordeiro<sup>1</sup>, Natasha Peixoto Fonseca<sup>1</sup>, Morghana Marina Villa<sup>1</sup>, Izadora Tabuso Vieira<sup>1</sup>, Luciana Hiromi Yoshino Kamino<sup>2</sup>, Flávio Fonseca do Carmo<sup>2</sup>, Angélica Sanchez<sup>1</sup>, Camila Carrião Machado Garcia<sup>1,3</sup>, Nalvo Almeida<sup>4</sup>, Jesus Aparecido Ferro<sup>5</sup>, Maria Inês Tiraboshiro Ferro<sup>5</sup>, Alessandro de Melo Varani<sup>5</sup>, Rafael Marini<sup>5</sup>, Vera Lúcia dos Santos<sup>6</sup>, Ubiana de Cássia<sup>6</sup>, João C Setubal<sup>7,8</sup>, Leandro Marcio Moreira<sup>1,3</sup>.

<sup>1</sup>Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB), Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brazil; <sup>2</sup> Instituto Prístino, Belo horizonte, MG, Brazil; <sup>3</sup> Departamento de Ciências Biológicas (DECBI), Instituto de Ciências Exatas e Biológicas (ICEB), Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto, MG, Brazil; <sup>4</sup>Faculdade de Computação (FACOM), Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil; <sup>5</sup> Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Departamento de Tecnologia, SP, Brazil; <sup>6</sup>Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, (UFMG), Belo horizonte, MG, Brazil; <sup>7</sup>Departamento de Bioquímica (DB), Instituto de Química (IQ), Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil; <sup>8</sup> Biocomplexity Institute, Virginia Tech, Blacksburg, VA, USA.

Quadrilátero Ferrífero (QF) é reconhecido por suas riquezas minerais. Ação antrópica vem dizimando espécies vegetais e animais e, consequentemente a microbiota associadas. O objetivo deste trabalho foi isolar bactérias de solos e associadas às plantas da região de canga e avaliar o seu potencial uso biotecnológico. Foram coletadas amostras de diferentes plantas e amostras de solos, sendo selecionados 68 isolados. Foram realizados ensaios de morfologia, além de ensaios de resistência a antibióticos e arsênio em paralelo a uma determinação do perfil de crescimento destes isolados. Os isolados são predominantemente bacilos (70%) gram positivos (80%), sendo 55 % capazes de produzir amilase, protease, celulase e AIA; 26% de produzir sideróforos e 9% de solubilizar fosfato inorgânico. Além disso, 65% dos isolados foram resistentes à ampicilina, nenhuma mostrou resistência a tetraciclina e 97% foram resistentes ao arsênio. Destaca-se o isolado FG3 (extraído de flor de gervão) neste trabalho. FG3 se mostra produtor de sideróforo, AIA, resistente à ampicilina e arsênio, além de apresentar taxa de crescimento acelerada comparada à *E. coli*. Análises moleculares revelaram a presença de dois plasmídeos (pFG3A e pFG3B), um dos quais conferindo resistência a arsênio em *E. coli* transformada (*E. coli*::pFG3B), além da resistência em ampicilina e elevar a taxa de crescimento do transformado. *E. coli*::pFG3B foi capaz de reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), a degradação do DNA e o aumento da atividade de catalase, assim como FG3. Ensaios mostram que FG3 não biotransforma arsenito em arsenato, sugerindo estar bioquulado. A partir destes resultados FG3 teve seu genoma completamente sequenciado, permitindo identificar o isolado uma *Serratia liquefaciens*. Análises genômicas comparativa estão em andamento para tentar identificar quais mecanismos estão relacionados com os achados empíricos, que até o momento são bastante interessantes numa perspectiva biotecnológica.

**Palavras chave:** Quadrilátero ferrífero, prospecção, resistência à arsênio, plasmídeo.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 024**

### **COMPARISON OF *Xanthomonas* SECRETOMES UNCOVERED NEW PUTATIVE MOONLIGHT PROTEINS**

Assis, RAB<sup>1</sup>; Paula, TVU<sup>1</sup>; Soares, MR<sup>2</sup>; and Moreira, LM<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica (DBq), Instituto de Química (IQ), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil. <sup>3</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brasil. Email: renatab.assis@uol.com.br

To better understand the biology of host–microbe interactions, we analyzed the results of 15 secretome studies of different *Xanthomonas* species with different host specificity. We focused on proteins that are highly expressed and secreted during infection or proteins expressed in conditions that simulate infection *in planta*. Aside from the group of proteins classically related to virulence (effectors of type II and III secretory systems, pathogen-associated molecular patterns, and cell wall degradation enzymes), these comparisons revealed other putative virulence factors (secreted proteins) as promising targets for drug development, many of which have been described in other studies as possible moonlighting proteins. The comparative analysis of the proteins highlighted in each of these 15 studies allowed us to group them into four functional categories: cellular processes and metabolism (CP/M), hypothetical proteins (HP), virulence and adaptation (V/A), and membrane-associated and transport (MA/T). More than 40% of all proteins were classified as CP/M in all secretomes suggesting that these proteins may have additional function when in contact with the host. With the advances in technologies related to identification of proteins expressed under different conditions, it is now possible to compare proteomic studies to understand the influence of a proteome on the lifestyle of these bacteria and their interactions with compatible hosts. In this review, we confirmed the importance of known proteins for processes of host interaction and virulence in *Xanthomonas*, but we also suggest other proteins heretofore unknown to be involved in these processes since many proteins identified in all secretomes analyzed have a potential to be moonlight proteins. Moreover, the finding that metabolic or chaperone proteins (that play crucial roles in bacteria–host interactions) also act as virulence factors evidence these moonlighting proteins are new likely targets for drug development.

**Keywords:** *Xanthomonas*, secretomes, moonlight proteins.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 025**

### **ANÁLISE FUNCIONAL DO VETOR PEXU CODIFICANDO A ORF DO GENE REPÓRTER M-CHERRY, UTILIZANDO BACTÉRIAS LÁTICAS COMO VEÍCULO DE ENTREGA**

Coelho-Rocha, N.D.<sup>1</sup>, Mancha-Agresti, P.<sup>1</sup>, Drummond, M.M.<sup>1</sup> <sup>2</sup>, Batista, V.L.<sup>1</sup>, de Jesus, L.C.L<sup>1</sup>, Prosperi C.C<sup>1</sup>, Azevedo, V.<sup>1</sup>

Laboratório de Genética Celular e Molecular<sup>1</sup>, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil, Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais<sup>2</sup>. Email: ninadcrocha@ufmg.br

O uso de bactérias láticas como veículo de entrega de vacinas de DNA vem gerando grande repercussão devido a sua capacidade de entregar plasmídeos vacinais à mucosa intestinal após a administração oral das mesmas, sendo uma alternativa segura às vacinas tradicionais. *Lactococcus lactis* é considerada a bactéria láctica modelo e tem sido utilizada para entrega de proteínas imunogênicas ou imunomoduladoras no nível de mucosas. Afim de se avaliar a expressão e localização de um vetor de expressão eucariótica no trato gastrintestinal mediada por estas bactérias, a ORF (Open Reading Frame) do gene repórter codificando a proteína fluorescente *m-Cherry* foi inserida no vetor pExu através do método de clonagem bacteriana, resultando no plasmídeo recombinante pExu:*m-Cherry*. Para tanto, a ORF da sequência codificadora de *m-Cherry* foi isolada por PCR a partir do plasmídeo PXJM19:*m-Cherry* para clonagem no vetor intermediário Zero Blunt® TOPO® e, posteriormente, clonagem no vetor pExu. A construção final, pExu:*m-Cherry*, primeiramente foi obtida em *Escherichia coli* TOP10, confirmada por PCR, digestão e sequenciamento. A funcionalidade do referido vetor foi verificada pelas técnicas de Microscopia Confocal e Citometria de Fluxo após transfecção em células CHO (Células de Hamster de Ovário). Por fim, o plasmídeo foi transformado em *L. lactis* MG1363, gerando assim a linhagem recombinante *L. lactis* MG1363 (pExu:*m-Cherry*), que foi administrada aos camundongos por gavagem. Os resultados obtidos por meio de microscopia confocal mostraram que há uma expressão marcante da proteína *m-Cherry* em enterócitos no duodeno, decaendo no íleo e sendo praticamente nula no jejun. Sendo assim, este trabalho constitui uma base para a validação da eficácia e efetividade de novas vacinas gênicas de entrega oral em mucosas mediada por bactérias láticas, utilizando o vetor pExu; o que poderá fornecer informações valiosas para a pesquisa e o desenvolvimento de vacinas contra diversos patógenos.

**Palavras chave:** vacina de DNA, clonagem bacteriana, bactérias láticas, pExu, *m-Cherry*  
**Apoio financeiro:** CNPq, CAPES, FAPEMIG, Fundação Ezequiel Dias (FUNED)



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 026**

### **CRIAÇÃO DE BACTÉRIA MUTANTE *Streptococcus agalactiae* HÍBRIDA DE PEIXE E HUMANO POR MEIO DE ALGORITMO GENÉTICO E METAHEURÍSTICA**

Aguiar, E. L.<sup>1</sup>, Mendonça, G. H. M.<sup>1</sup>, Dias, S. R.<sup>1</sup>, Rodrigues, T. S. <sup>1</sup>, Almeida, P.E.M.<sup>1</sup>, Martins, F. V. C.<sup>1</sup>

1 - Cefet-Mg, Belo Horizonte, MG, Brasil

Email: edgarlaguiar@gmail.com

Os microrganismos podem ser classificados e observados em diferentes reinos biológicos, sendo amplamente distribuídos pela natureza, podendo ser detectados nos lugares mais “hostis”, afetando diretamente o padrão ambiental e outros organismos. Neste trabalho serão geradas bactérias mutantes *Streptococcus agalactiae* por meio de Algoritmos Genético e *Simulated Annealing*, combinando os genes de bactérias encontradas em peixes e humanos, e sua posterior classificação em uma máquina de inferência *Fuzzy*, possibilitando o estudo de como seriam estas possíveis bactérias e como tratá-las de forma preventiva. Os resultados evidenciam que as bactérias geradas pelo algoritmo possuem bons atributos tanto em nível de adaptabilidade quanto em probabilidade de sobrevivência, sendo bons padrões para um estudo aprofundado de suas cargas genéticas e características, além das consequências de sua existência. Isso fica notável ao perceber que todas as 11 bactérias alcançaram pontuação de mais de 60% para ambos os atributos considerados tanto pela classificação da máquina *Fuzzy* quanto pelo especialista genômica. Aplicação da Máquina *Fuzzy* se mostrou muito útil para auxiliar na toma de decisões e na classificação do perfil de cada bactéria, pois através da mesma foi possível condensar diversas regras criando um classificador funcional e até mesmo replicável a outros micro-organismos. Podemos observar que após execuções dos algoritmos foi possível gerar mutantes híbridos humano e peixe factíveis que tiveram bons resultados para adaptabilidade e sobrevivência.

**Palavras-chave:** *Streptoccus Agalactiae*. Algoritmo Genetico. Inteligência Computacional. Simulated Annealing. Fuzzy.

**Apoio Financeiro:** Cefet-Mg



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 027**

**COMPARATIVE ANALYSIS OF 69 COMPLETE Xanthomonadaceae GENOMES REVEALS SEVEN EFFECTOR PROTEIN FAMILIES WITH DIVERSE ADAPTIVE AND EVOLUTIONARY HISTORIES**

Assis, RAB<sup>1+</sup>; Polloni, LC<sup>2+</sup>; Patané, JSL<sup>3</sup>; Thakur, S<sup>4</sup>; Felestrino, EB<sup>1</sup>; Caballero, JD<sup>4</sup>; Digiampietri, LA<sup>5</sup>; Goulart, LR<sup>2</sup>; Almeida, NF<sup>6</sup>; Nascimento, R<sup>2</sup>; Dandekar, AM<sup>7</sup>; Zaini, PA<sup>2</sup>; Setubal, JC<sup>3</sup>; Guttman, DS<sup>4,8</sup>; and Moreira, LM<sup>1,9\*</sup>

<sup>1</sup>Center of Research in Biological Science, Federal University of Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brazil. <sup>2</sup>Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil. <sup>3</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil. <sup>4</sup>Department of Cell & Systems Biology, University of Toronto, 25 Willcocks St., Toronto, Ontario M5S 3B2, Canada. <sup>5</sup>Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil. <sup>6</sup>School of Computing, Federal University of Mato Grosso do Sul, Mato Grosso do Sul, MS, Brazil. <sup>7</sup>Department of Plant Sciences, University of California, Davis, CA, USA. <sup>8</sup>Centre for the Analysis of Genome Evolution and Function, University of Toronto, 25 Willcocks St., Toronto, Ontario M5S 3B2, Canada. <sup>9</sup>Department of Biological Science, Institute of Exact and Biological Science, Federal University of Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brazil. Email renatab.assis@uol.com.br

The Xanthomonadaceae family consists of species of non-pathogenic and pathogenic  $\gamma$ -proteobacteria that infect different hosts, including humans and plants. In this study, we performed a comparative analysis using complete genomes of 69 bacterial strains belonging to this family, with a focus on identifying protein families enriched in phytopathogens that could explain the lifestyle and the ability to infect plants. We retrieved protein sequences for all 69 bacterial strains from the NCBI database and predicted orthologs and paralogs among them using OrthoMCL algorithm. The analysis of the presence or absence of each protein family among the 69 genomes allowed identification of proteins families exclusive of each strain, conserved in all genomes, and that are shared by a subset of bacterial strains. It was possible to identify seven phytopathogen-enriched families, all putatively secreted by type II secretory system. *In silico* and phylogenetic analyses of these protein families revealed that, they all have orthologs in other phytopathogenic or symbiotic bacteria and are involved in the modulation and evasion of the immune system. As a proof of concept, we performed a biochemical characterization of LipA from Xac306 and verified that the mutant strain lost most of its lipase and esterase activities and displayed reduced virulence in citrus. Since this study includes closely related microorganisms with distinct lifestyles and highlights proteins directly related to adaptation inside plant tissues, novel approaches might use these proteins as biotechnological targets for disease control, and contribute to our understanding of the coevolution of plant-associated bacteria.

**Keywords:** Xanthomonadaceae, plant-associated microorganisms, comparative genomics, modulation of immune system, plant-bacteria coevolution

Supported by Projeto BIGA-CAPES, CNPq



## **RESUMOS**

**Número: 028**

### **DIVERSIDADE GENÉTICA DA COMUNIDADE DE MICRORGANISMOS DA RIZOSFERA DE GENÓTIPOS DE MILHO E SORGO CULTIVADOS EM CONDIÇÕES DE CAMPO SOB DIFERENTES FONTES E NÍVEIS DE FÓSFORO**

Campolino, M.L.<sup>1,2</sup>; Lana, U.G.P.<sup>2</sup>; Coelho, A.M.<sup>2</sup>; Gomes, E.A.<sup>2</sup>; de Sousa, S. M.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Bioengenharia, Universidade Federal de São João del-Rei, São João del-Rei, MG, Brasil. <sup>2</sup>Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, Brasil. E-mail: [mlcampolino@hotmail.com](mailto:mlcampolino@hotmail.com)

Os fertilizantes químicos têm sido fundamentais para a intensificação da agricultura. Entretanto, eles também contribuem para poluição generalizada por nutrientes, além de aumentarem os custos de produção. Os cereais recebem quase metade das aplicações de fertilizantes fosfatados no mundo. Sendo assim, a eficiência de uso do fósforo (P) dos fertilizantes fosfatados deve ser aumentada, visando uma agricultura mais sustentável e uma alternativa é utilizar fontes menos solúveis de P associadas a genótipos mais eficientes. Além disso, a simbiose entre plantas e fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e/ou bactérias solubilizadoras de P pode contribuir para aumentar a aquisição e o crescimento das plantas cultivadas. Desse modo o objetivo desse estudo foi avaliar a diversidade genética da população de FMA e bactérias da rizosfera de genótipos de milho e sorgo cultivados sob diferentes fontes e níveis de P. Quatro genótipos de milho e quatro de sorgo foram cultivados em condições de campo na safra de 2016/17, sob três fontes de P, totalmente solúvel (superfosfato triplo), parcialmente solúvel (fosfato reativo - Bayóvar) e insolúvel (fosfato de rocha - Itafós) e três doses de P, 0, 50 e 100 Kg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ha<sup>-1</sup>. Amostras de solo rizosférico e solo não rizosférico (controle) foram coletados na época do florescimento e analisadas pela técnica de T-RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos terminais de restrição). Dentro de cada cultura, o genótipo e o tipo de fonte fosfatada não interferiram significativamente na comunidade microbiana. Porém, foi verificado o efeito da dose de P dentro de cada fonte fosfatada na estruturação da comunidade microbiana, com formação de três grupos distintos, tanto para FMA quanto para bactérias. Esses resultados sugerem que a disponibilidade de P é o fator predominante na estruturação das comunidades bacterianas e FMA na rizosfera de milho e sorgo nos genótipos avaliados.

**Palavras chaves:** T-RFLP, Fungos micorrízicos arbusculares, Comunidade bacteriana, *Zea mays*, *Sorghum bicolor*

**Apoio financeiro:** Embrapa, CNPq, Fapemig, Capes.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 029**

### **ANÁLISE DE MICROCULTIVO E TERMOFILIA DE ISOLADOS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**

Almeida, A.C.<sup>1</sup>; Benassi, V. M.<sup>2</sup>; Amorim, I.<sup>3</sup>; Soares de Oliveira, M.F.<sup>3</sup>; Carvalho e Silva, C. H.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bolsista de Mestrado CAPES-Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis.<sup>2</sup> Professora do Instituto de Ciência e Tecnologia-UFVJM Diamantina-MG. <sup>3</sup>Discente de Iniciação Científica UFVJM Diamantina-MG. E-mail:alinecrit@gmail.com

Os fungos filamentosos têm importante aplicação biotecnológica por possuírem capacidade de produzir enzimas. Assim, o conhecimento do gênero e condições ideias de cultivo auxiliam na exploração de enzimas com potencial biotecnológico. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi analisar o possível gênero dos fungos filamentosos isolados em distintas áreas, e verificar a taxa de crescimento dos mesmos em distintas temperaturas. Coletaram-se amostras de quatro lugares distintos: i. da área de aterro sanitário desativada dentro dos limites da UFVJM; ii. Área de campo rupestre quartizítico; iii área de campo rupestre ferruginoso degradado, e iv. área de campo rupestre ferruginoso conservado. Além dessas áreas foram isolados fungos de dois fragmentos de mandioca em decomposição. Os isolados foram cultivados em câmara de microcultivo contendo meio Sabourad, à 30°C, para análise do possível gênero, e a análise da temperatura de crescimento dos isolados foi realizada à 30°C, 35°C, 40°C e 45°C, sendo medido o halo de crescimento após 48h de cultivo, e calculou-se a taxa de crescimento em centímetro/hora. Pode-se visualizar estruturas conidiogênicas nos isolados que se assemelham as estruturas dos gêneros: *Rhizopus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Rizoctonia*, *Aspergillus* e *Trichoderma*. A partir da termofilia pode-se observar que quatro fungos obtiveram maior crescimento em relação aos demais, sendo que o isolado AL221 apresentou maior taxa de crescimento 0,254 cm/h seguidos de AL131 com 0,247cm/h, KI341 com 0,183 cm/h e AQ832 com 0,182cm/h. Concluímos que foi possível visualizar estruturas conidiogênicas em 36 isolados e que o isolado AL221 apresentou maior taxa de crescimento a 30 graus.

**Palavras-chave:** Fungos filamentosos, Biotecnologia, Enzimas,

**Apoio Financeiro:** CAPES, ICT/UFVJM.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número:030**

### **DIVERSIDADE E BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À PLANTA MEDICINAL *Lafoensia pacari***

Amorim, S. S.<sup>1</sup>; Assis, J. C. S. <sup>1</sup>; Carvalho, C. R. <sup>1</sup>; Sales, P. A<sup>2</sup>; Alves, T. M. A. <sup>3</sup>; Zani, C. L. <sup>3</sup>; Rosa, L. H. <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia Polar e Conexões Tropicais, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. <sup>2</sup>Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisa René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte MG. <sup>3</sup>Laboratório de Química de Produtos Naturais, Centro de Pesquisa René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte MG. E-mail: [sorayasander@gmail.com](mailto:sorayasander@gmail.com)

Fungos endofíticos são aqueles que colonizam o interior de tecidos vegetais por pelo menos uma fase de seu ciclo de vida sem causar nenhum sintoma aparente de doença. Estes fungos vêm demonstrando ser uma potencial fonte de metabólitos secundários bioativos de interesse farmacológico. Entre as plantas alvos para o estudo da comunidade dos endofíticos, as plantas medicinais representam uma fonte promissora de fungos bioativos. De acordo com o exposto acima, o objetivo deste estudo foi caracterizar a comunidade de fungos endofíticos associados à *Lafoensia pacari*, planta medicinal presente no Pantanal Mato-grossense, bem como avaliá-la como fonte de metabólitos antiparasitários. A partir de fragmentos de folhas, cascas e sementes de *L. pacari* foram isolados 236 fungos filamentosos e três leveduras. A identificação dos fungos filamentosos foi realizada por meio do sequenciamento da região ITS-5.8S do gene do rRNA, e pelo sequenciamento parcial do gene da β-tubulina. As leveduras foram submetidas ao sequenciamento dos domínios D1/D2 da subunidade maior do DNA ribossomal. Até o momento foram identificados 45 táxons de fungos filamentosos, e três de leveduras. As sementes de *L. pacari* foram germinadas em meio Murashige & Skoog e Wood Plant para o isolamento de seus fungos endofíticos a partir das plântulas. Das plântulas foram isolados quatro fungos “endofíticos verdadeiros”. Os extratos diclorometânicos produzidos a partir dos fungos endofíticos, folhas e cascas de *L. pacari* foram avaliados quanto às atividades frente ao *Trypanosoma cruzi*. Seis extratos fúngicos e dez extratos vegetais apresentaram atividade tripanossomicida variando de 70 a 99% de inibição. Em adição, os extratos inibiram o crescimento parasitário em baixas concentrações e baixa toxicidade às células de mamíferos. Com base nos resultados obtidos é possível afirmar que a planta medicinal *L. pacari* representa um promissor reservatório de fungos endofíticos capazes de produzir metabólitos bioativos.

**Palavras chave:** fungos endofíticos, *Lafoensia pacari*, cultura de tecidos, metabólitos secundários bioativos.

**Apoio Financeiro:** CAPES, CNPq, FAPEMIG.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 031**

### **OBTENÇÃO DE MUTANTES DE CISTEÍNA ÚNICA DE EIF5A-2 DE HUMANO PARA ENSAIOS DE INTERAÇÃO COM O RIBOSSOMO**

Comar, M.A.B.; Zanelli, C.F.; Valentini, S.R.

Laboratório de Biologia Molecular e Celular de Microrganismos, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP, Araraquara, SP. E-mail: mabcomar@gmail.com

A proteína eIF5A é um fator de elongação da tradução altamente conservado em arqueas e eucariotos, sendo essencial para a viabilidade celular em todos os organismos testados. eIF5A é a única proteína que contém o aminoácido hipusina sendo este essencial para a sua função, gerado por uma modificação pós-traducional. Apenas mais recentemente foi melhor definido o papel de eIF5A no processo de síntese proteica, mas especificamente durante a etapa de elongação da tradução, onde se liga à subunidade 60S do ribossomo montado e promove o alívio de sua parada quando este está traduzindo *motifs* sequenciais de prolina. Na levedura *Saccharomyces cerevisiae* eIF5A é codificada por *TIF51A* e por *TIF51B*, dependendo da disponibilidade de oxigênio no ambiente; enquanto em humano existem duas isoformas, sendo que eIF5A-1 (*EIF5A1*) é produzida constitutivamente e eIF5A-2 (*EIF5A2*) apenas em alguns tecidos. Além disso, é possível observar a presença de eIF5A-2 em alguns processos tumorais. Para melhor elucidar o mecanismo de eIF5A-2 na tradução, é necessário determinar como ocorre sua ligação com o ribossomo e em que tipo de complexo ribossomal se liga. Com o intuito de se buscar diferenças funcionais entre eIF5A-1 e eIF5A-2 de humano, e compará-las a eIF5A de levedura, foram produzidos neste trabalho seis mutantes de cisteína única de eIF5A-2 de humano para uso em ensaios que permitirão a determinação do tipo de complexo ribossomal ao qual a proteína se liga e a afinidade do complexo. Dos seis mutantes obtidos, cinco se demonstraram funcionais nos ensaios de complementação em levedura e, assim, podem ser utilizados para ensaios subsequentes de interação com o ribossomo. Estes ensaios poderão contribuir de maneira importante para o entendimento das diferenças funcionais das isoformas de eIF5A de humano com relação ao seu papel na tradução, podendo elucidar também a função de eIF5A-2 nas linhagens tumorais em que está presente.

**Palavras chave:** eIF5A, ribossomo, levedura, *Saccharomyces cerevisiae*, humano, eIF5A-2, processos tumorais, mutantes, complementação

**Apoio financeiro:** FAPESP



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 032**

### **OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASE E CELULASE POR *Penicillium* sp. M89 UTILIZANDO A TORTA DE MACAÚBA (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.) COM FONTE DE CARBONO EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA.**

Nascimento, C.S.<sup>1</sup>; Santos, V.L.<sup>2</sup>; Andrade, M.H.C.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Engenharia química – UFMG, Brasil.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Microbiologia –Instituto de Ciências Biológicas-UFMG, Brasil.

O presente trabalho teve como enfoque principal, estudar a produção das enzimas lipase e celulase por *Penicillium* sp. M89, utilizando como substrato a torta residual do processo de extração do óleo da polpa de frutos da Macaúba. Primeiramente, com o objetivo de analisar as variáveis significativas no processo, foi efetuado o delineamento fatorial fracionado de níveis mistos L12 com as propriedades pH, temperatura, concentração da torta de macaúba (TM), concentração e tipo de fonte de nitrogênio. As variáveis concentração da TM e o tipo de fonte de nitrogênio influenciaram ( $p<0,05$ ) a produção lipases, enquanto que a variável temperatura ( $p<0,05$ ) influenciou a produção de celulases. Os resultados obtidos permitiram direcionar o planejamento experimental da segunda fase de otimização por meio de um delineamento central rotacionado (DCCR), culminando na seguinte estratégia: a) manter pH 5; b) manter a concentração da fonte de nitrogênio a 2%; c) utilizar como fonte de nitrogênio o extrato de levedura; d) avaliar as variáveis concentração da TM e temperatura. Em seguida, por meio do DCCR, obteve-se resultados de otimização que permitiram a estipular as condições ótimas de produção simultânea das enzimas: a) para  $\text{UmL}^{-1}$ , a melhor condição foi de 3,5% de TM e 33,7°C; b) para  $\text{Umg}^{-1}$  de proteína total a melhor condição foi 2,5% de TM e 34,4°C; c) para U/g de biomassa, a condição óptima foi de 2,5% e 40°C. Posteriormente, foi realizada a caracterização do extrato bruto obtido na ótima condição de produção simultânea de lipase e celulase. A atividade óptima para lipase foi obtida em temperatura de 40°C ( $1,07 \pm 0,03 \text{ UmL}^{-1}$ ), pH 8 ( $0,94 \pm 0,001 \text{ UmL}^{-1}$ ) e substrato ótimo o p-nitrofenol palmitato ( $0,85 \pm 0,01 \text{ UmL}^{-1}$ ). A atividade óptima da celulase foi obtida em temperatura de 45°C ( $0,074 \pm 0,003 \text{ UmL}^{-1}$ ) e pH 5 ( $0,050 \pm 0,011 \text{ UmL}^{-1}$ ). A otimização resultou em um aumento na produção das enzimas, abrindo perspectivas para a otimização do processo de fermentação utilizando a torta de macaúba.

**Palavras-chave:** Lipase; celulase; macaúba; *Penicillium* sp.; fermentação; protease.

**Apoio Financeiro:** CAPES, Departamento de Engenharia Química- UFMG e Departamento de Microbiologia UFMG.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 033**

**TÍTULO: IDENTIFICAÇÃO E ANALISE DE DEFENSINAS NO GENOMA DE *Ananas comosus (L.) Merril***

Almeida, I.P.<sup>1</sup>; Borges, D.S.<sup>1</sup>; Barbosa, A.E.A.D<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Engenharia Genética Vegetal, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Campus Avançado de Patos de Minas.

As plantas, frequentemente, são expostas à ataques de pragas e patógenos que afetam o seu crescimento, desenvolvimento e produtividade. E para se proteger desses patógenos elas apresentam sistemas de defesa químicos muito eficientes, e entre estes podemos destacar os peptídeos antimicrobianos. As defensinas são peptídeos antimicrobianos que apresentam atividades antibacteriana e antifúngica e que têm sido estudadas como fonte para novos antibióticos. As defensinas são catiônicas, apresentam de 45 a 54 aminoácidos, 6 a 8 resíduos de cisteína e de três a quatro pontes de dissulfeto. E o abacaxi é um vegetal que pode conter em seu genoma genes de defensinas, mas estes ainda não foram estudados. Por isso, o objetivo do estudo foi identificar os genes defensinas no genoma do abacaxi (*Ananas Comosus (L.) Merril*) por meio de ferramentas de bioinformática. Inicialmente sequências de defensinas previamente caracterizadas foram utilizadas em alinhamento local (TBLASTn) contra os genes do genoma do abacaxi. Em seguida o domínio conservado das defensinas foi confirmado por análise do Blast2Go. Foram identificados 6 genes no genoma do abacaxi apresentando o domínio defensina. As estruturas 3D foram obtidas usando o Swiss-Model e apresentaram similaridades com as estruturas das defensinas. Os genes foram classificados em diferentes grupos usando análise filogenética. Portanto, foi observado que o genoma do *A. comosus* apresenta genes de defensinas, e estes genes podem ser utilizados no desenvolvimento de novos antibióticos e de plantas resistentes a doenças.

**Palavras-chave:** *Ananas comosus*, defensinas, antimicrobianos.

**Apoio Financeiro:** UFU



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 034**

### **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE LEVEDURAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE *Pseudobrickellia brasiliensis***

Cardoso, V. M.<sup>1</sup>; Victoria, S. A. G.<sup>1</sup>; Santos, C. J.<sup>1</sup>; Campos, F. F<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Bioprocessos, Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, UFVJM, Diamantina, MG. <sup>2</sup>Faculdade de Medicina, UFVJM, Diamantina, MG, Brasil. E-mail: valeriaufvjm@hotmail.com

Microrganismos resistentes a múltiplos fármacos constituem ameaças constantes à saúde humana. Portanto, há uma necessidade contínua de descoberta de novos medicamentos para combater infecções. Microrganismos endofíticos vivem em simbiose dentro dos tecidos das plantas e são fontes promissoras para a descoberta de novas drogas antimicrobianas. *Pseudobrickellia brasiliensis* é uma planta medicinal conhecida como arnica-do-mato encontrada no cerrado, na região de Diamantina, Minas Gerais. Acredita-se que plantas medicinais do cerrado possam abrigar microrganismos endofíticos com potencial químico diversificado. Este estudo teve por objetivo avaliar o potencial antibacteriano de leveduras endofíticas isoladas da planta medicinal *Pseudobrickellia brasiliensis*. Quatorze isolados de leveduras foram testados quanto ao potencial antibacteriano. Os metabólitos extraídos em acetato de etila foram obtidos após fermentação das leveduras inoculadas em caldo Sabouraud dextrose por 7 dias a 30 °C e 125 rpm de agitação. Os extratos foram avaliados nas concentrações de 1000 µg/mL, 500 µg/mL e 250 µg/mL frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 usando o método da microdiluição em placa. As leituras foram realizadas visualmente após 24 e 48 h de incubação da microplaca a 37 °C. Quatro extratos na concentração de 1000 µg/mL demonstraram visualmente inibição do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, sendo submetidos a diluição em solução salina estéril e plaqueamento em ágar Sabouraud. O mesmo procedimento foi realizado para o Controle positivo da placa de microdiluição (meio inoculado com *P. aeruginosa*). Um extrato diminuiu em  $5 \times 10^5$  vezes o número de colônias de *P. aeruginosa* quando comparado com o Controle positivo. Os outros três extratos apresentaram inibição do crescimento de *P. aeruginosa* de aproximadamente 50 vezes. Estes resultados são promissores uma vez que os testes foram realizados com os extratos brutos.

**Palavras Chave:** Leveduras endofíticas, Extratos, Atividade Antibacteriana

**Apoio Financeiro:** UFVJM



## **RESUMOS**

**Número: 035**

### **INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DE *Fusarium verticillioides* POR METABÓLITOS PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE PLANTAS DE MILHO**

Diniz, G.F.D.<sup>1</sup>; dos Santos, K.K.B.<sup>2</sup>; Soares, E.A.C.<sup>2</sup>; Aguiar, F.M.<sup>3</sup>; Cota, L.V.<sup>3</sup>; Cury, J.C.<sup>1</sup>; Marriel, I.E.<sup>3</sup>; Oliveira, C.A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de São João del-Rei, Campus de Sete Lagoas, MG. <sup>2</sup>Centro Universitário de Sete Lagoas, MG. <sup>3</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. Email: giselediniz@gmail.com

*Fusarium verticillioides* é o principal patógeno do milho, causador de doenças como podridão radicular, podridão do colmo e da espiga. O controle biológico utilizando microrganismos pode ser uma alternativa para reduzir os custos de produção e efeitos negativos do uso de defensivos químicos. O objetivo do trabalho foi avaliar o potencial de metabólitos produzidos por bactérias isoladas de plantas de milho na redução do crescimento micelial de *F. Verticillioides*. As bactérias utilizadas nesse trabalho foram selecionadas em outro experimento e apresentaram potencial de inibição de *F. verticillioides* em testes de cultura pareada. Colônias puras dos isolados foram crescidas em 50 ml de meio TSB - Tripticaseína de soja e mantidas a 28 °C a 90 rpm por três dias. Após este período, as colônias foram centrifugadas a 6.000 rpm por 10 minutos e filtradas em membranas de 0,22µm. O sobrenadante de cada antagonista foi transferido para erlenmeyers de 250 ml onde foram adicionados três discos de 5mm da borda do micélio do fitopatógeno em três repetições. Erlenmeyers contendo apenas meio TSB e discos do fitopatógeno foram utilizados como controle. Durante dez dias os erlenmeyers foram incubados a 28 °C de forma estacionária, permitindo o crescimento da massa micelial. Posteriormente, a biomassa foi filtrada utilizando-se gaze. As biomassas foram secas a 60°C até peso constante e em seguida pesadas. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Houve diferença significativa para todos os isolados testados em relação ao controle. Das dez bactérias testadas, sete apresentaram maiores valores de inibição (87% a 98%) não havendo diferença significativa entre elas. Conclui-se que as bactérias utilizadas nesse trabalho foram capazes de produzir compostos que inibiram o crescimento de *F. verticillioides* e deverão ser submetidas a testes para avaliar o seu potencial antagônico em plantas de milho.

**Palavras-chave:** fungos, antagonismo, grãos, biocontrole

**Apoio Financeiro:** FAPEMIG, EMBRAPA, UFSJ, CNPq



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 036**

### ***Aspergillus fumigatus: ANÁLISE IN SILICO DAS SUBUNIDADES β CATALÍTICAS DO PROTEASSOMA***

Almeida I.P<sup>1</sup>; Macedo, P.V. <sup>1</sup>; Gomes, S. A.<sup>1</sup>; Trindade, N.S. <sup>1</sup>; Viana, J. S. <sup>1</sup>; Gomes, M. S. <sup>2</sup>; Morais, E. R. <sup>1</sup>

<sup>1</sup>LBBM, INGEB, UFU, *Campus Avançado de Patos de Minas - MG*. E-mail: [Isabelle\\_ptu@hotmail.com](mailto:Isabelle_ptu@hotmail.com)

<sup>2</sup>LBAM, INGEB, UFU, *Campus Avançado de Patos de Minas - MG*.

*Aspergillus fumigatus* é um fungo oportunista que pode causar a aspergilose invasiva pulmonar, com elevadas taxas de mortalidade, mesmo após a administração de terapia antifúngica. A via da Ubiquitina-Proteassoma, atua no turnover de proteínas intracelulares e é fundamental para a sobrevivência e proliferação celular. O objetivo do estudo foi caracterizar *in silico* as subunidades β catalíticas do proteassoma do fungo à procura de alvos potenciais para novos fármacos. As sequências das subunidades β foram recuperadas no NCBI e usadas na busca de proteínas homólogas no banco de dados genômico do fungo (AspGd). As sequências ortólogas foram alinhadas no algoritmo ClustalX2, os domínios conservados e sítios ativos foram analisados pelo Pfam e CDD. A análise filogenética foi realizada utilizando método Neighbor-Joining e a distância evolutiva foi computada utilizando o modelo JTT. A análise filogenética foi realizada no programa Mega5.2. A análise das sequências permitiu a identificação das subunidades: β1 (Afu7g04650), β2 (Afu2g04910), β5(Afu6g08310). O domínio Proteasome (PF00227) foi identificado em todas as subunidades β catalíticas em *A. fumigatus*. O estudo do Proteassoma em *Aspergillus fumigatus* apresenta novas abordagens para elucidar os mecanismos de patogênese desse microrganismo contribuindo para a identificação de novos alvos potenciais para intervenções terapêuticas.

**Palavras-chave:** *Aspergillus fumigatus*; Aspergilose; Proteassoma; Bioinformática

**Agradecimento:** PROPP-DIRITT-UFU (Projeto n° IT-CNPQ2016-BIO002)



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 037**

### **PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE EUKARYOTIC INITIATION FACTOR 2 (eIF-2 $\alpha$ ) ALPHA KINASES USING MAXIMUM-LIKELIHOOD METHOD**

Assunção C. B.<sup>1</sup>; Machado, A. S.<sup>1</sup>; Vieira, V. C. S.<sup>2</sup>; Fernandes, J.B.<sup>1</sup>; Rodrigues, F.<sup>2</sup> and Caligorne, R. B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte, MG, Brasil. <sup>2</sup>Universidade do Minho, Braga, Portugal. E-mail: [rachelbc@santacasabh.org.br](mailto:rachelbc@santacasabh.org.br).

In all eukaryotes, phosphorylation of the  $\alpha$  subunit of eIF2 is a major mechanism to adjust the cellular gene expression profile in response to specific cues. The eIF2 $\alpha$  kinases are a group of serine-threonine kinases that perform important functions and are essential for response to infection, proteotoxicity, and low levels of nutrients. In *Paracoccidioides brasiliensis*, findings suggest that a down-regulation of eIF2 $\alpha$  kinases promotes a significant delay in the morphological transition from yeast to mycelium. To date, there are no reliable studies about eIF2 $\alpha$  kinases on black yeast. Some biological processes mediated by eIF2 $\alpha$  kinases are universally conserved from yeast to humans, in addition, kinases proteins are highly conserved between taxonomic kingdoms. In this way, this work purpose comparing sequences of eIF2 $\alpha$  kinases in different classes of fungi, in order to design molecular markers for taxonomy and identification of black fungi species. We compared the eIF2 $\alpha$  kinases sequences with known DNA sequences deposited in the Nr database using BLASTn program. The sequences obtained were aligned using Clustal program. The alignments were analysed by Phylip package by the maximum likelihood method, to generate the phylogenetic trees. The trees generated showed grouping of the species according to their taxonomic classification, demonstrating that eIF2 $\alpha$  kinases presents a conserved evolution among species. These findings inviting us to deepen in the study about kinases genes.

**Keywords:** Black fungi, kinases, Phylogeny.

**Financial support:** FAPEMIG, CNPq.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 038**

### **PRODUÇÃO DE MUDAS DE ALFACE EM SMS DE *Agaricus subrufescens***

Cunha, J.R.B.<sup>1</sup>; Torga, A.M.P.<sup>1</sup>; Collela, C.F.<sup>1</sup>; Vilela, L.F.<sup>1</sup>; Dias, E.S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de cultivo de cogumelos comestíveis. Programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola. Departamento de Biologia. Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil. E-mail: [joice.raisa@gmail.com](mailto:joice.raisa@gmail.com)

A alface é uma das hortaliças mais comuns nas refeições dos brasileiros e é geralmente produzida a partir de mudas adquiridas comercialmente. As sementes precisam de água para iniciar o processo de germinação e de fertilizantes, para que se inicie o desenvolvimento da muda. Os substratos para a produção de mudas devem ter características físico-químicas que permitam a embebição de água pela semente e características nutricionais que atendam às necessidades da espécie vegetal. A utilização de SMS tem sido relatada na produção de mudas e o grande volume deste resíduo é um problema ambiental. Este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de mudas de alface em SMS de *Agaricus subrufescens*. As mudas foram produzidas em três tratamentos: 100% do substrato comercial Tropstrato®; 50% do SMS de *A. subrufescens* e 50% do substrato comercial Tropstrato®; e 100% de SMS de *A. subrufescens*, por 17 dias e foram avaliados parâmetros físicos das mudas e germinativos das sementes. A taxa de germinação das sementes em 100% de SMS foi de 86,25% e não diferiu significativamente dos demais tratamentos. O tempo médio de germinação das sementes em 100% de SMS diferiu dos demais tratamentos e foi de 5,5 dias, contra 4,7 e 4,9 dias para as cultivadas em 0 e 50% de SMS, respectivamente. As velocidades médias de germinação e os índices de velocidade de germinação não apresentaram diferença entre os tratamentos. O número de folhas não foi diferente em nenhum dos tratamentos, já o tamanho de parte aérea diminuiu à medida que se aumentou a concentração de SMS no substrato, e as únicas mudas que tiveram raízes de tamanho reduzido foram as produzidas em 100% de SMS. Apesar da diferença na altura média das mudas, a utilização de 50 ou 100% de SMS pode ser uma alternativa promissora para a redução dos custos de produção de mudas de alface, em função dos preços dos substratos comerciais disponíveis, representando ainda uma destinação ambientalmente correta do SMS de *A. subrufescens*.

**Palavra chave:** Hortaliças, substrato, cogumelos

**Apoio Financeiro:** CAPES, FAPEMIG, CNPq e UFLA.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 039**

### **LINHAGENS DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ISOLADAS DE DORNAS DE FERMENTAÇÃO DE CACHAÇA COM POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE CERVEJA**

Matos, T. T. S.; Duarte, A. C. N.; Sander, A. N.; Rosa, C.A.

Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos, Departamento de Microbiologia, ICB, UFMG, Belo Horizonte, MG.  
e-mail: thelmatirones@gmail.com

Com uma produção anual superior a 1,97 bilhões de hectolitros por ano, a cerveja é a bebida fermentada mais produzida no mundo; a fim de agradar o paladar dos consumidores, necessita ser rica em sabores, aromas e refrescância. O mercado nacional de cervejas é bastante promissor, e tem se expandido rapidamente pelo país, com o aumento do número de produtores. Atualmente, toda a produção de cerveja especial no Brasil depende da importação de leveduras comerciais e ainda não existe um banco de linhagens nacionais de leveduras cervejeiras, diante disso, o estabelecimento de linhagens de leveduras nacionais pode diminuir os custos da produção, além de elevar a identidade genuína do produto com características relevantes de aromas e qualidade do produto. Desde modo, 139 linhagens de *S. cerevisiae* isoladas de dornas de fermentação de cachaça depositadas na Coleção de Micro-organismos e Células da UFMG foram inicialmente triadas pela avaliação da fermentação da maltose em temperaturas de 10 e 20 °C (temperaturas estas, de fermentação da cerveja tipo *lager* e *ale*, respectivamente) e avaliação da produção de sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ). Entre as 139 linhagens triadas, 96 apresentaram a capacidade de fermentar a maltose a 10°C e 121 foram capazes de fermentar a 20°C, sendo que 28 e 121 linhagens das temperaturas 10 e 20 °C, respectivamente, apresentaram o perfil de fermentação igual ao controle. Para avaliação da produção do  $H_2S$ , 68 linhagens foram produtoras do  $H_2S$  um gás com odor de ovo que é indesejada na produção de cervejas. O estudo está no inicio, porém, as linhagens selecionadas se mostraram como promissoras para uma posterior produção de cerveja e, portanto, testes futuros como a capacidade de fermentação da maltotriose, produção de etanol e substâncias killer serão executados para confirmação da levedura como boa produtora de cerveja. Após os resultados dos testes aplicados, as melhores leveduras serão empregadas em uma produção de cerveja em escala piloto.

**Palavras chave:** *Saccharomyces cerevisiae*;cerveja; fermento; levedura.

**Apoio financeiro:** CAPES, FAPEMIG e CNPq



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 040**

### **CONSTRUÇÃO E EXPRESSÃO DE DUAS PROTEÍNAS DO VÍRUS CHIKUNGUNYA EM SISTEMA PROCARIOTO E AVALIAÇÃO DE SEU POTENCIAL COMO FERRAMENTAS DIAGNÓSTICAS**

**BAGNO, F. F.\*; SERUFO, A. V\*; LEOCÁDIO, V. A. T.\*; DA FONSECA, F. G.\***

\* Laboratório de Virologia Básica e Aplicada, Depto de Microbiologia, ICB/UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. E-mail: [flavia.bagno@gmail.com](mailto:flavia.bagno@gmail.com)

*Chikungunya virus* (CHIKV) é um membro da família *Togaviridae*, causador da febre Chikungunya, uma arbovirose que representa um problema de saúde pública para regiões tropicais e subtropicais do globo. Quatro genótipos de CHIKV foram identificados mundialmente enquanto que, no Brasil, já foi constatada a circulação de dois deles: um africano, denominado East-Central-South-African (ECSA) e um Asiático. Este trabalho teve como objetivo a construção e expressão de duas proteínas estruturais, E1 e E2, que fazem parte do envelope do CHIKV, em sistema procarioto. Inicialmente, foram selecionadas sequências encontradas no Brasil, sendo estas analisadas juntamente com sequências pertencentes aos genótipos circulantes no Brasil. Análises filogenéticas permitiram classificar genotipicamente amostras brasileiras ainda não caracterizadas. Gerou-se uma sequência única para cada gene codificador das proteínas, com posteriores estudos *in silico* para avaliar estrutura e propriedades físico-químicas das mesmas. Optou-se pela remoção das porções transmembrana com posterior otimização de códons para uma melhor expressão em sistema procarioto. As sequências nucleotídicas codificadoras das proteínas sintéticas foram clonadas em pET21a. Bactérias de expressão transformadas foram induzidas com IPTG, seguindo-se de análise por SDS-PAGE. O potencial antigênico predito pelo software VAXIJEN\_v2.0 foi de 0,51 e 0,55 (prováveis抗ígenos) para E1 e E2, respectivamente. Constatou-se uma melhor expressão da proteína E1 sob a incubação *overnight* a 1 mM de IPTG enquanto que, para a proteína E2, a melhor condição de indução foi a 2mM por 1 hora. Géis de poliacrilamida revelaram bandas de alturas esperadas para a proteína E1 (46 kDa) e E2 (42 kDa). Foi possível concluir que, ainda sob diferentes condições de indução, ambas as proteínas foram expressas de forma eficaz. Perspectivas futuras incluem a purificação das proteínas produzidas e a avaliação do potencial antigênico das mesmas.

**Palavras chave:** *Chikungunya virus*, febre chikungunya, expressão heteróloga.

**Apoio financeiro:** CNPQ e CAPES



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 041**

### **PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS VP1 E VP2 EM PROCARIOTO PARA DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DIAGNÓSTICOS PARA O SENECAVIRUS A**

Leocadio, V.A.T<sup>1</sup>; Oliveira, T.F.P<sup>1,2</sup>; Giannattasio-Ferraz, S<sup>1</sup>; Carmargos, M.F<sup>2</sup>; Barbosa-Stancioli, E. F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Virologia Básica e Aplicada, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais

<sup>2</sup> LANAGRO/MG, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Av. Rômulo Joviano s/n, Fazenda Modelo, Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brasil.

Email: [vleocadio@gmail.com](mailto:vleocadio@gmail.com)

O Senecavirus A (SVA) é um vírus suíno da Ordem *Picornavirales*. Este vírus foi descoberto acidentalmente em 2002 como contaminante de células PER.C6 e ainda há pouco conhecimento sobre ele, contabilizando menos de 50 trabalhos publicados. O SVA é responsável pela indução de duas síndromes conhecidas: a doença idiopática vesicular suína (PIVD) e a mortalidade neonatal epidêmica transiente (ETNL). A PIVD não é considerada uma doença debilitante. Já a ETNL pode causar taxa de mortalidade em suínos neonatos em até 90%. A PIVD vem sendo reportada em alguns países desde a década de 80, mas a primeira associação com o SVA ocorreu somente em 2008, nos EUA. Ambas as síndromes já foram observadas em um grande surto em 2015 em fazendas dos estados do Sul, Sudeste e Centro-Oeste, causando enormes prejuízos financeiros ao Brasil. Além dos prejuízos econômicos (especialmente relacionados à ETNL), o SVA tornou-se também importante devido à indução de doenças vesiculares com clínica assemelhada com a Febre Aftosa (FA), doença de notificação obrigatória, passando o SVA a fazer parte dos agentes testados na triagem desta virose. Dada a importância crescente do SVA, sua inserção como um dos agentes da triagem para a FA e a relativa ausência de ferramentas para o diagnóstico da infecção, o objetivo deste trabalho é expressar as proteínas virais 1 e 2 (VP1 e VP2) do SVA em sistema heterólogo procarioto para posterior detecção de anticorpos anti-SVA em soros de suínos que apresentem ou não sinal de doenças vesiculares. Até o presente momento, ambas as sequências das proteínas já foram amplificadas do material genético do vírus e clonadas no plasmídeo pGem T-Easy. Estes foram digeridos e os insertos liberados serão clonados no plasmídeo pET-21a, que será utilizado para expressão das proteínas em estudo. As perspectivas do trabalho incluem a utilização de um ELISA para a detecção de anticorpos anti-SVA, além de um estudo epidemiológico da doença a partir do diagnóstico da mesma.

**Palavras-chave:** Senecavirus A, diagnóstico, proteínas recombinantes.

**Apoio financeiro:** CAPES e CNPQ



## **RESUMOS**

**Número: 042**

### **IMUNÓGENO COMPOSTO POR NANOBASTÕES DE OURO FUNCIONALIZADOS COM PROTEÍNAS DOS VÍRUS DA DENGUE GERA PROTEÇÃO FRENTE À DESAFIO EM MODELO ANIMAL**

Alice F. Versiani<sup>1</sup>; Laura J. Cox<sup>1</sup>; Vivian Vasconcelos Costa<sup>3</sup>, Danielle da Glória de Souza<sup>3</sup>; Luiz O. Ladeira<sup>2</sup>; Flávio G. Da Fonseca<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Virologia Básica e Aplicada, Departamento de Microbiologia, UFMG, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratório de Nanomateriais, Departamento de Física, UFMG. <sup>3</sup> Laboratório de Interação Microrganismo Hospedeiro, Departamento de Microbiologia, UFMG. E-mail: [afversiani@gmail.com](mailto:afversiani@gmail.com)

A Dengue é uma das doenças infecciosas mais importante no Brasil, em termos de impacto epidemiológico e, consequentemente, o desenvolvimento de uma vacina eficaz sempre foi considerado alta prioridade. De fato, algumas estratégias vacinais apresentam resultados encorajadores, embora análises de eficácia ainda levantam dúvidas sobre a aplicabilidade em todos os países onde a doença ocorre. A nanotecnologia é um campo de pesquisa interdisciplinar, sendo os nanobastões de ouro (GNR) de particular interesse, especialmente por suas propriedades ópticas, sua química de superfície e a sua baixa toxicidade em sistemas biológicos. Este trabalho utiliza a tecnologia dos GNR para construir um imunógeno baseado na glicoproteína do envelope (E) do *Dengue virus*, proteína imunodominante capaz de gerar anticorpos neutralizantes sorotipo específicos. Este imunógeno foi testado previamente, sendo capaz de gerar altos níveis de anticorpos IgG e neutralizantes, assim como resposta celular robusta, com a secreção de citocinas importantes como IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-17a após estimulação *in vitro*. Para este trabalho, fêmeas C57/Bl6 imunizadas foram desafiadas com o vírus DENV-3 ( $1 \times 10^7$  PFU/mL) e aspectos clínicos e fisiopatológicos foram analisados 48hs pós-infecção. Este modelo de infecção mimetiza a doença, portanto os camundongos não-imunizados e desafiados apresentaram elevação do hematócrito e da permeabilidade vascular, e baixa no número de plaquetas. Entretanto, os animais imunizados com a ferramenta GNRpE apresentaram perfil clínico similar ao animal não desafiado, ou seja, sem sintomas. Além disso, uma análise do perfil de citocinas pós-desafio também foi realizada e reproduzem os resultados anteriores, agora *in vivo*. Análises da presença de RNA viral em tecidos e ativação de células de memória serão realizadas para concluir o perfil de proteção deste imunógeno. Não obstante, todos os resultados obtidos até o momento tornam esta uma promissora alternativa vacinal para a Dengue.

**Apoio financeiro:** CNPq, CAPES, INCT Vacinas



## **ÁREA: SAÚDE**

**Número: 043**

### **BIOATIVIDADE ANTICOAGULANTE E ANTIMICROBIANA DO ÓLEO VEGETAL EXTRAÍDO DA *Copaifera multijulga***

Pessoa. M. S<sup>1</sup>; Silva. T. O<sup>1</sup>; Ambrósio. S. R<sup>2</sup>; Oliva. M. L. V<sup>3</sup>; Brito. M. V<sup>1</sup>; Carvalho. M. T. M<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Curso de Biomedicina – Universidade do Estado de Minas Gerais – UEMG – Unidade de Passos. <sup>2</sup> Universidade de Franca – UNIFRAN – SP <sup>3</sup> Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – Campus São Paulo. E-mail: [matheusantanap@gmail.com](mailto:matheusantanap@gmail.com)

Em todo o mundo há uma busca contínua por novos e eficazes agentes anticoagulante e antimicrobiano, preferencialmente que possuam múltiplos alvos e não apresentem efeitos colaterais. Pesquisas com extrato de plantas medicinais como agentes anticoagulantes representa uma área de interesse considerável por apresentarem uma diversidade metabólica; o mesmo podemos dizer para os estudos desenvolvidos que avaliam a ação antimicrobiana desses extratos em concentrações diferentes a partir de uma bactéria de interesse. Um exemplo encontrado na biodiversidade brasileira é a *Copaifera multijuga*, encontrada em Manacapuru - AM onde o óleo extraído do tronco através da técnica de incisão é utilizado como fitoterápico em diversas enfermidades como inflamação, antioxidantes e antimicrobianas. Devido a essas propriedades, avaliamos a ação do óleo da *Copaifera multijuga* sobre a coagulação sanguínea como um possível agente anticoagulante e sua ação antimicrobiana. A atividade anticoagulante do óleo foi mensurada através de ensaios “in vitro” utilizando Plasma Pobre em Plaquetas (PRP) para a determinação do Tempo de Protrombina (TP) e do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPa). O óleo prolongou o TP em 1,2 vezes na concentração de 0,5 mg, entretanto, o TTPa prolongou 5,7 e 1,3 vezes quando utilizada as concentrações de 0,5; 0,125mg respectivamente. A atividade antimicrobiana, foi testada a partir de discos contendo penicilina G 50 mg foi utilizado como controle. Após 24 horas, os halos de inibição, quando formados, foram medidos e comparados com os controles para demonstrar a inibição e crescimento conforme a concentração de extrato contida em cada um. Os resultados mostraram que o extrato utilizado nas concentrações de 10; 5; 2.5; 1,0 µg/ml foi capaz de inibir o crescimento do *S. aureus* quando comparado com os controles. Nossos resultados, em conjunto indicam que o óleo extraído *Copaifera multijuga* pode ser útil para estudos futuros em modelos de coagulação e antibacteriano.

**Palavras Chave:** Bioatividade, extrato, *Copaifera multijuga*, coagulação, antimicrobiano  
**Apoio financeiro:** FAPEMIG



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 044**

### **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS CONTRA BACTÉRIAS DE INTERESSE CLÍNICO**

Serafim, M.S.M.<sup>1</sup>; Lavorato, S.N.<sup>2</sup>; Oliveira, G.P.<sup>3</sup>; Santos, S.G.<sup>4</sup>; Kroon, E.G.<sup>3</sup>; Alves, R.J.<sup>2</sup>; Mota, B.E.F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia Clínica, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte, MG.

<sup>2</sup>Laboratório de Química Farmacêutica, Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte, MG.

<sup>3</sup>Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG.

<sup>4</sup>Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG.

E-mail: tsa\_mateus@hotmail.com

As infecções bacterianas são doenças de grande relevância clínica, destacando-se as infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e suas complicações, como os casos de sepse bacteriana, responsável por altas taxas de mortalidade em unidades de tratamento intensivo (UTI) no mundo. Dentre algumas das principais bactérias envolvidas, destacam-se *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. Além de sua prevalência, algumas linhagens costumam apresentar importantes níveis de resistência aos antimicrobianos, como *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA). Devido à falta de opções disponíveis para o tratamento destas bactérias, torna-se necessário a busca de novas moléculas com atividade antimicrobiana. O objetivo deste trabalho foi avaliar, por meio de testes de microdiluição em caldo, a possível atividade antibacteriana de 46 substâncias sintéticas. Por meio de triagem utilizando 10 µg/mL das substâncias, selecionaram-se aquelas que apresentaram inibição total do crescimento bacteriano, para as quais foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). Além destes, realizou-se a avaliação de viabilidade celular pelo teste colorimétrico de MTT, obtendo-se os índices de seletividade (IS). Por último, avaliou-se a relação estrutura-atividade dos compostos. Dentre as substâncias testadas, aquelas denominadas 20, 21 e 22 apresentaram atividade contra as bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *E. faecalis* e *S. pyogenes*), além de linhagens MRSA. Os testes de CIM e CBM mostraram valores entre 2,5 e 10 µg/mL, apresentando IS variando entre 0,25 e 2,18. Os substituintes dicloro, alfa-naftil e beta-naftil relacionaram-se às melhores atividades. Conclui-se que três substâncias apresentaram potencial para serem utilizadas como fármacos antibacterianos, inclusive em infecções causadas por bactérias multirresistentes aos antimicrobianos de uso clínico.

**Palavras chave:** Substâncias sintéticas. Atividade antibacteriana. *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. MRSA. Antimicrobianos. Gram-positivas.

**Apoio financeiro:** PRPq



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 045**

### **EFEITO ANTIMICROBIANO DO EXTRATO BRUTO DAS SEMENTES *PTERODON ERMARGINATUS* “SUCUPIRA-BRANCA” SOBRE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*.**

Silva. T. O.<sup>1</sup>; Lima. A. L.<sup>1</sup>; Pereira. F. O.<sup>1</sup>; Pessoa. M. S.<sup>1</sup>; Oliva. M. L. V.<sup>2</sup>; Carvalho. M. T. M.<sup>1</sup>; Brito. M. V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Curso de Biomedicina – Universidade do Estado de Minas Gerais – UEMG – Unidade de Passos. <sup>2</sup> Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – Campus São Paulo. E-mail: [tabathaformiga@hotmail.com](mailto:tabathaformiga@hotmail.com)

A resistência de patógenos como *Staphylococcus aureus* a antibióticos é um problema de saúde mundial, isso justifica a busca de produtos naturais como novas alternativas ao estudo de diferentes mecanismos de ação e/ou que regulem a virulência e a ação infecciosa desses organismos, visando obter moléculas para a produção de novos fármacos. O Brasil é detentor de uma grande biodiversidade, além de despertar interesse por seu potencial biotecnológico; associado a esses fatores, podemos dizer que o interesse por plantas na medicina popular aumentou consideravelmente, nesse contexto, alguns estudos demonstram a ação de extratos de plantas como agentes antimicrobianos de interesse clínico, atuando na redução da virulência ou decesso dos mesmos. Objetivou-se com este estudo, avaliar pela técnica de antibiograma, o efeito do extrato obtido das sementes da espécie *Pterodon emarginatus*, sobre o crescimento de *S. aureus* inoculado em meio ágar Muller-Hinton. Para a realização dos ensaios, discos de papel de filtro estéril, embebidos com diferentes concentrações do extrato de *Pterodon emarginatus* foram depositados sobre a superfície do meio ágar após a inoculação por semeadura, da cultura de *S. aureus*. Discos contendo penicilina G 30 mg e salina foram utilizados como controle. Após 24 horas, os halos de inibição, quando formados, foram medidos e comparados com os controles para demonstrar a inibição e crescimento conforme a concentração de extrato contida em cada um. Os resultados mostraram que o extrato cetônico utilizado nas concentrações de 500; 50; 5; 2.5; 0,5 µg/ml foi capaz de inibir o crescimento do *S. aureus* quando comparado com os controles. As concentrações que mostraram uma inibição do crescimento do microrganismo, futuramente, serão estudadas *in vivo* utilizando o modelo de sepse causada por *S. aureus* em camundongos.

**Palavras chave:** *Pterodon emarginatus*, sepse, *Staphylococcus aureus*, produtos naturais, antibióticos.

**Apoio financeiro:** FAPEMIG



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 046**

### **ANÁLISE DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E SENSORIAL DE BOLOS PRODUZIDOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FARINHA DE CASCA DE MARACUJÁ E MAÇÃ VERDE**

Souza, J.P.M<sup>1</sup>; Magalhães, C.D.S<sup>1</sup>; Gonçalves, K.S.G<sup>1</sup>; Duarte, N.B.A<sup>1</sup>; Lima, D.S<sup>1</sup>; Fabrini, S.P<sup>1</sup>; Sande, D<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde do Centro Universitário de Belo Horizonte - UNIBH. Belo Horizonte, MG. E-mail: [ju.liana2011@yahoo.com.br](mailto:ju.liana2011@yahoo.com.br)

Maracujá e Maçã possuem compostos bioativos antioxidantes e hipoglicemiantes. Farinhas são elaboradas com o conteúdo integral dessas frutas para serem empregadas em produtos. Para entregar a qualidade sensorial e funcional das farinhas e seus produtos, primeiro eles devem ser seguros para consumo. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade microbiológica e sensorial de bolos elaborados com diferentes concentrações de farinhas de casca de maçã e maracujá. Foram analisados bolos com concentrações de 10, 15 e 50% (em relação à farinha de trigo). Para avaliar a segurança alimentar, foi feita uma pesquisa de coliformes a 35 e 45°C, utilizando a técnica dos tubos múltiplos. Para avaliar a qualidade sensorial aplicou-se em 69 provadores não treinados de uma comunidade acadêmica, um teste subjetivo (escala hedônica de 1 a 9 variando desde gostei extremamente até desgostei extremamente). Para análise da relação entre a aceitação geral e as variáveis gênero e frequência de consumo foi utilizado teste Kruskal-Wallis. Na contagem dos coliformes a 35 e 45°C obteve-se resultados satisfatórios quanto a segurança alimentar (<3NMP/g). Foi detectada a presença de coliformes a 35 e a 45 °C, apenas no bolo com farinha de maçã a 10 % (7 NMP/g e 7 NMP/g, respectivamente), porém dentro da tolerância permitida. A amostra preferida dos bolos de maçã foi a de 15% (mediana 9), já os de maracujá não diferiram (mediana 8) para as concentrações de 10 e 15%, no entanto, a mediana foi 6 para os de 50%. Não houve diferença significativa entre a mediana da nota de aceitação geral em relação ao gênero e frequência de consumo seja para as concentrações ou para os sabores. Conclui-se que os bolos estavam microbiologicamente seguros e obtiveram boa aceitação sensorial. Assim, infere-se que preparações como a do estudo devem conter entre 10 e 15%, devem ser elaboradas em condições higiênicas adequadas e podem ser direcionadas ao paladar de diferentes perfis de consumidores.

**Palavras-chave:** Análise sensorial, Coliformes, farinha funcional, reaproveitamento

**Órgão financiador:** Centro Universitário Belo Horizonte - UNIBH



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 047**

### **ADJUNCTIVE THERAPY WITH VITAMIN B12 IS NEUROPROTECTIVE TO THE HIPPOCAMPUS IN AN INFANT RAT MODEL OF PNEUMOCOCCAL MENINGITIS AND THIS POSITIVE EFFECT MAY INVOLVE EPIGENETIC REGULATION**

Queiroz, K.B.<sup>1</sup>; Cavalcante-Silva, V.<sup>2</sup>; D'Almeida, V.<sup>2</sup>; Rocha, G. A.<sup>3</sup>, Lopes, F. L.<sup>4</sup>; Coimbra, R. S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Neurogenômica e Imunopatologia, Fiocruz Minas, Belo Horizonte, MG. <sup>2</sup>Departamento de Psicobiologia, Escola Paulista de Medicina, UNIFESP-EPM, SP. <sup>3</sup>Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia e Departamentos de Patologia e Medicina, Faculdade de Medicina, UFMG, Belo Horizonte, MG. <sup>4</sup>Faculdade de Medicina Veterinária, UNESP, Araçatuba, SP. E-mail: karinabq@gmail.com

Bacterial meningitis causes homocysteine (Hcy) accumulation at neurotoxic levels in the cerebrospinal fluid of children. The Hcy pathway controls the bioavailability of methyl and its homeostasis is critical for some epigenetic processes. Vitamin B<sub>12</sub> is a safe and inexpensive drug capable of regulating the Hcy pathway leading to an increase in the cell methylation capacity. We assessed the neuroprotective potential of adjunctive therapy with B<sub>12</sub> in an infant rat model of pneumococcal meningitis. Also, we evaluated B<sub>12</sub> effect in the methylation capacity and down-regulation of pro-inflammatory genes in the hippocampus. Eleven-day-old rats intracysternally infected with *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 had a reduced percentage of global methylated DNA at 24 post infection, but adjunctive therapy with B<sub>12</sub> restored this parameter to normal levels. Accordingly, adjunctive B<sub>12</sub> increased the methylation capacity of hippocampal cells, as inferred from the ratio S-adenosyl methionine (SAM):S-adenosyl homocysteine (SAH). Meningitis increased transcription of pro-inflammatory genes *Ccr2*, *Ccl3* and *Il-1β* in the hippocampus, whereas B<sub>12</sub> downregulated these genes. In the infected group treated with B<sub>12</sub>, Hcy hippocampal concentration positively correlated with the apoptotic score in the dentate gyrus granular layer of the ipsilateral hippocampus ( $r = 0.80, P < 0.05$ ), and negatively correlated with *Ccr2* expression ( $r = -1.00, P < 0.05$ ). In the infected group receiving placebo, SAM:SAH inversely correlated with *Ccr2* levels ( $r = -0.68, P < 0.05$ ). Interestingly, B<sub>12</sub> downregulated *Dnmt3a* transcription, which is probably a negative feedback loop. In conclusion, vit. B<sub>12</sub> post-treatment is neuroprotective in an infant rat model of pneumococcal meningitis and this effect may involve methyl-dependent epigenetic regulation of neuroinflammatory genes.

**Keywords:** meningitis, neuroprotection, vitamin B12, epigenetics, homocysteine, methyl-donor.

**Financial support:** CNPq, FAPEMIG and FIOCRUZ



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 048**

### **RESVERATROL ACTS ANTI-INFLAMMATORY AND NEUROPROTECTIVE IN AN INFANT RAT MODEL OF PNEUMOCOCCAL MENINGITIS BY MODULATING THE HIPPOCAMPAL MIROME**

Queiroz, K.B.<sup>1</sup>; Pereira, T. S. F.<sup>2</sup>; Araújo, M. S. S.<sup>3</sup>; Gomez, R. S.<sup>2</sup>; Coimbra, R. S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Neurogenômica, Fiocruz Minas, Belo Horizonte, MG; <sup>2</sup>Departamento de Cirurgia Oral e Patologia, Escola de Odontologia, UFMG, Belo Horizonte, MG; <sup>3</sup>Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores, Fiocruz Minas.

Resveratrol (RSV) has anti-inflammatory and neuroprotective properties, and cross the blood-brain barrier (BBB) with a safe profile. Besides, RSV modulates the expression of some miRNAs related to neurological disorders. Thus, we hypothesized that RSV can be neuroprotective in pneumococcal meningitis by modulating the global microRNA profile (miRome). Eleven-day old rats were intracysternally infected with *S. pneumoniae*, or sterile saline, and were orally administered with adjuvant RSV, or placebo at 3h and 18h post infection. At 24h p.i. animals were euthanized and apoptotic cells were counted in the granular layer of the dentate gyrus in Nissl stained microscope slides from the right brain hemispheres. The hippocampi from left hemispheres were used for cytokines and chemokines analysis with Milliplex, and global miRNA profiling (TaqMan® OpenArray® Rodent MicroRNA panel, with 750 validated rodent miRNAs). Infected rats treated with RSV had lower apoptotic scores and IL-1 $\beta$ , CCL<sub>2</sub>, and CCL<sub>3</sub> protein levels when compared to the infected group receiving placebo. Seven miRNAs were downregulated, and 18 were upregulated by meningitis. Thirty-seven miRNAs were downregulated, and three were upregulated (hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-125b-5p) by the interaction between meningitis and RSV. Pathway enrichment analysis revealed that meningitis and RSV act antagonically in crucial pathways related to the pathophysiology of meningitis by differentially regulating the hippocampal miRome. Nevertheless, hsa-miR-25-3p and hsa-miR-125b-5p target the transcription factor TEF, for which there are binding sites in the regulatory regions of IL-1 $\beta$ , CCL<sub>2</sub>, and CCL<sub>3</sub>. Thus, adjuvant therapy with RSV is anti-inflammatory and neuroprotective in an infant rat model of pneumococcal meningitis and these positive effects involve the modulation of the hippocampal miRome. Also, we provide herein the first snapshot of the hippocampal miRome in the acute phase of pneumococcal meningitis.

**Keywords:** meningitis, neuroprotection, resveratrol, microRNA, miRome.

**Financial support:** CNPq, FAPEMIG and FIOCRUZ



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 049**

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE *LACTOBACILLUS CASEI* BL23 EM LEITE FERMENTADO ENRIQUECIDO DE WHEY PROTEIN AO STRESS ÁCIDO**

Sara Heloisa Da Silva<sup>1</sup>; Fillipe Luiz Rosa do Carmo<sup>1</sup>; Bárbara Fernandes Cordeiro<sup>1</sup>; Emiliano Rosa Oliveira<sup>1</sup>; Bruna Machado Savassi<sup>1</sup>; Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho<sup>1</sup>; Vasco Azevedo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Genética Celular e Molecular, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. E-mail: saraheloisas@gmail.com

Os probióticos são, de acordo com a OMS, microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Os principais probióticos são bactérias, sendo a maioria pertencente ao grupo de bactérias lácticas. Dentre as diversas linhagens de *Lactobacillus* que apresentam propriedades imunomodulatórias, a *L. casei* BL23 se destaca pela sua capacidade anti-inflamatória na colite induzida em camundongos por sulfato de sódio dextrano, o que a torna uma candidata promissora para tratamentos de Doenças Inflamatórias Intestinais (DII). A investigação da sobrevivência destas bactérias após a passagem pelo trato gastrointestinal (TGI) é importante para avaliar seu potencial como probiótico contra as DII. Neste contexto, estudos recentes tem mostrado que o uso de matrizes pode proteger as bactérias durante a passagem pelo TGI. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a proteção do Whey Protein (WP) na sobrevivência de *L. casei* BL23 após o estresse ácido (pH 2.0). Para os ensaios de sobrevivência *in vitro*, *L. casei* foi crescida em leite em pó (12%) enriquecido com diferentes concentrações de WP (5% p/v, 15% p/v e 30% p/v) que foram submetidos ao desafio em pH ácido (pH 2.0). O leite contendo *L. casei* com 30% de WP apresentou uma maior taxa de sobrevivência ( $1,5 \times 10^7$  UFC/mL) quando comparado às diferentes concentrações de WP ( $5,0 \times 10^6$  UFC/mL e  $1,0 \times 10^7$  UFC/mL, 5% e 15%, respectivamente). Portanto, o enriquecimento do leite com WP aumentou a viabilidade das bactérias após o desafio, e consequentemente, representa maior probabilidade de sobreviver ao contato com o ácido estomacal. Este estudo foi um importante passo para o desenvolvimento de um produto probiótico baseado em leite fermentado. Futuramente, serão realizados novos ensaios, *in vitro*, para investigar a sobrevivência de *L. casei* BL23 à outras condições simuladas do TGI.. E finalmente, essa abordagem poderá ser investigada em ensaios pré-clínicos de colite.

**Palavras-chave:** probióticos; bactérias lácticas; *Lactobacillus*; *Lactobacillus casei* BL23.

**Instituições financiadoras/ parceiras:** CNPq



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 050**

### **CARACTERÍSTICAS GERAIS DE *Lactobacillus rhamnosus* E IMPORTÂNCIA PARA A SAÚDE HUMANA**

SILVA, T.M.L.<sup>1</sup>; ASSIS, D.C.S.<sup>1</sup>, BRITO, R.F.<sup>1</sup>, DIAS, R.G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: thaismichelle02@hotmail.com

A espécie *Lactobacillus rhamnosus* foi descrita pela primeira vez pelos pesquisadores Sherwood Gorbach & Barry Goldin. Foi o primeiro gênero a ser empregado em bacteroterapia e bactoprofilaxia, iniciadas no começo do século XX, com trabalhos de Metchnikoff, que apontou a importância do gênero na manutenção de uma microbiota intestinal equilibrada, inibindo micro-organismos indesejáveis. O gênero *Lactobacillus* é composto por bactérias Gram positivo, anaeróbicos facultativos ou que crescem em microaerofilia, não esporuladas, catalase negativo, que possuem morfologia celular variando de cocos, cocobacilos ou bacilos. Com base nas características bioquímicas o gênero é dividido em três grupos de acordo com o tipo de fermentação do açúcar: homofermentativa obrigatória, heterofermentativa facultativa e heterofermentativa obrigatória. Estes micro-organismos crescem em temperaturas que variam de 2°C a 53°C, com valores ótimos em torno de 30°C a 40°C, e são acidúricos, com crescimento em pH ótimo entre 5,5 e 6,2. Os produtos lácteos fermentados são os principais alimentos onde *L. rhamnosus* são encontrados, estando presentes em uma variedade de queijos, iogurtes, bebidas lácteas, kefir, entre outros, nos quais são utilizados como culturas *starter* e/ou adjuntas do processo fermentativo. Além disso, é a espécie mais frequentemente usada como probiótico, principalmente por ser considerado GRAS (*Generally Recognised As Safe*), o que lhe confere o status de seguro, não patológico e incapaz de transmitir fatores de resistência para bactérias patogênicas. O uso de *L. rhamnosus* apresentou efeito benéfico no tratamento dos sintomas da depressão e ansiedade em cobaias, além de aumentar a imunidade, restaurar microbiota urogenital e intestinal evitando assim infecções por micro-organismos. Entretanto, apesar do seu reconhecido potencial probiótico e benefícios variados, ainda são necessárias pesquisas para determinar a dosagem de *L. rhamnosus* a ser usada para cada caso em específico.

**Palavras-chave:** Bactéria, *Lactobacillus*, probiótico.



## **RESUMOS**

**Número: 051**

### **EFEITO PROTETOR DE *L. diolivorans* 1Z ISOLADO DE GRÃOS DE KEFIR NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium EM MODELO MURINO GNOTOXÊNICO**

Abatemarco, M.J<sup>1</sup>., Sandes, S.H.C<sup>2</sup>., Arantes, R.M.E<sup>3</sup>., Nunes, A.C<sup>2</sup>., Nicoli., J.R<sup>1</sup>., Neumann, E<sup>1</sup>. Email: mario.abatemarco@gmail.com

<sup>1</sup> Laboratório de Fisiologia e Ecologia de Microrganismos – Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.<sup>2</sup> Laboratório de Genética Molecular de Protozoários Parasitas Microrganismos – Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. <sup>3</sup> Laboratório de Neuroimunopatologia Experimental – Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

Vários efeitos benéficos têm sido atribuídos à ingestão do kefir. Parte dos efeitos benéficos pode ser atribuída aos lactobacilos presentes na microbiota dos grãos, o que os torna uma fonte de microrganismos com potencial probiótico. Assim sendo, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial probiótico de lactobacilos isolados de grãos de kefir cultivados em leite ou em água açucarada. Cinco amostras de lactobacilos foram submetidas a um ensaio para avaliar a taxa de sobrevivência e variação de peso em animais convencionais, tratados ou não, e desafiados oralmente com *Salmonella* Typhimurium. *L. diolivorans* 1Z foi selecionado para dar continuidade no estudo por ter apresentado os melhores resultados (70% dos animais sobreviveram e continuaram ganhando peso durante todo o período avaliado). Animais isentos de germe monoassociados com *L. diolivorans* 1Z foram desafiados oralmente com *S. Typhimurium* (grupo PS). Os animais foram sacrificados nos tempos dois, quatro, seis e oitos dias após a infecção. A contagem de salmonela nas fezes dos animais PS foi estatisticamente menor a partir do quarto dia de infecção quando comparado com o grupo CS ( $P<0,05$ ). A análise histopatológica revelou menor dano a mucosa ileal nos animais do grupo PS em relação ao grupo CS (Controle *Salmonella*) a partir do sexto dia após a infecção o que poderia ser justificado pela diminuição da contagem de salmonela e pela menor expressão das citocinas pró-inflamatórias IFN-g e TNF-a. A contagem de salmonela no fígado dos animais PS foi menor em relação ao grupo CS, alcançando níveis indetectáveis após o sexto dia após a infecção o que poderia ser explicado por um aparente aumento das células de Küpffer no grupo PS. Os resultados desse trabalho sugerem que *L. diolivorans* 1Z é capaz de proteger a morte dos animais pela infecção por *S. Typhimurium*, aparentemente por mecanismos imunológicos e não imunológicos que merecem ser aprofundados.

**Palavras chaves:** Kefir, grãos de kefir, *Lactobacillus*, probiótico



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 052**

**PHOTODYNAMIC THERAPY CONTROLS *Staphylococcus aureus* INTRADERMAL INFECTION IN MICE**

Almeida, P.P.<sup>1,2</sup>; Pereira, I.S.<sup>1</sup>; Rodrigues, K.B.<sup>1</sup>; Leal, L.S.<sup>1</sup>; Marques, A.S.<sup>1</sup>; Rosa, L.P.<sup>1</sup>; Rosa, F.C.S.<sup>1</sup>; Silva, R.A.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Multidisciplinary Health Institute, UFBA, Vitória da Conquista, BA, Brazil. <sup>2</sup> Department of General Biology, UFV, Viçosa, MG, Brazil. Email: [pahporto@gmail.com](mailto:pahporto@gmail.com)

Infections caused by *Staphylococcus aureus* lead to skin infections, as well as soft tissues and bone infections. Given the communal resistance to antibiotics developed by strains of this bacterium, photodynamic therapy emerges as a promising alternative treatment to control and cure infections. Females of Balb/C mice were infected with  $10^8$  CFU of Methicillin Resistant *S. aureus* (MRSA) and divided into four distinct groups: P-L- (negative control group); P+L- (group exposed only to curcumin); P-L+ (group exposed only to LED incidence 450 nm, 75 mW/cm<sup>2</sup>, 54 J/cm<sup>2</sup> for ten minutes), and P+L+ (group exposed to curcumin followed by ten minutes of LED irradiation)(n = 24). The mice were euthanized 48 and 72 hours after infection, and biologic materials were collected for analysis of the bacterial load, peripheral blood leukocyte counts and draining lymph nodes cell counts. The normalization of data was checked and the ANOVA test was applied. The bacterial load in the draining lymph node of P+L+ group was lower when compared to the control groups 72 hours post infection ( $p < 0.0001$ ), indicating that the LED incidence associated with curcumin controls the staphylococci intradermal infection. The number of the total lymph node cells shows to be lower than control groups in the two availed times ( $p < 0.01$ ). The histological analysis and the counting of white blood cells did not show differences among cells in the blood and in the tissue of infection. This is the first report showing that photodynamic therapy may be effective against MRSA infection in a murine model of intradermal infection.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*; curcumin; blue light; LED.

**Funding Support:** CNPq, FAPESB, UFBA.



## RESUMOS

Número: 053

### PERFIL DAS INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO COMUNITÁRIAS ASSOCIADAS A *Enterobacter*: GÊNERO, FAIXA ETÁRIA, ETIOLOGIA E SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA

Borges, AMP<sup>1</sup>; Ferreira, JFG<sup>1</sup>; Sousa, MAB<sup>2</sup>; Farias, LM<sup>1</sup>; Magalhães, PP<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. <sup>2</sup>Hermes Pardini, Belo Horizonte, MG.

O gênero *Enterobacter*, criado em 1960, é composto por bastonetes Gram negativos anaeróbios facultativos, móveis e capsulados. Atualmente, o gênero, que tem sofrido alterações taxonômicas frequentes, é composto por 36 espécies e cinco subespécies. *Enterobacter* faz parte do grupo ESKAPE, que abriga microrganismos reconhecidos como um desafio para a área de saúde, muito prevalentes e associados a dificuldades no tratamento, devido à alta capacidade em expressar resistência antimicrobiana. O gênero está frequentemente associado à etiopatogenia de infecções dos tratos respiratório e urinário, bem como bactеремia. A infecção do trato urinário é a segunda doença de natureza infecciosa mais prevalente em seres humanos. O envolvimento do gênero *Enterobacter* tanto em infecções relacionadas à assistência à saúde como em infecções comunitárias, inclusive infecção do trato urinário, é crescente. Este estudo analisou a associação entre *Enterobacter* e infecção do trato urinário comunitária e o perfil de suscetibilidade antimicrobiana das amostras. Foram avaliados 550 pacientes diagnosticados com ITU associada a *Enterobacter* no Hermes Pardini, Belo Horizonte, no período de novembro/2014 a abril/2015. Foram detectadas as espécies *E. aerogenes* e *E. cloacae*, nas frequências de 44,7% e 55,3%, respectivamente. Observou-se grande predomínio de pacientes do sexo feminino, 78,5%. O perfil de faixa etária demonstrou que a imensa maioria dos pacientes tem mais de 15 anos de idade (92,5%), com a seguinte distribuição: 16-30 anos = 23,8%, 31-60 anos = 35,3% e > 60 anos = 33,4%. Todas as amostras expressaram resistência à ampicilina e suscetibilidade à polimixina B. Detectou-se frequência elevada de resistência a cefalosporinas de 1ª (96,8%) e 2ª (97,7%) gerações e alta taxa de suscetibilidade a carbapenêmicos (0,9%). De forma geral, os dados corroboraram a literatura. A caracterização das amostras, no que se refere a mecanismos de resistência antimicrobiana, está sendo realizada.

**Palavras Chave:** Infecção do trato urinário comunitária, *Enterobacter*, perfil de suscetibilidade antimicrobiana

**Apoio Financeiro:** CNPq, CAPES, FAPEMIG e PRPq/UFMG.



## **RESUMOS**

**Número: 054**

### **AVALIAÇÃO GENOTÍPICA DA RESISTÊNCIA A $\beta$ -LACTÂMICOS EM AMOSTRAS DE *Klebsiella pneumoniae* ISOLADAS DE PACIENTES COM INFECÇÃO URINÁRIA COMUNITÁRIA**

Campos, P.M.C<sup>1</sup>; Ferreira, J. F. G<sup>1</sup>; Sousa, M.A.B.<sup>2</sup>; Magalhães, P. P.<sup>1</sup>; Farias, L.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios. Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG; <sup>2</sup>Hermes Pardini, Belo Horizonte, MG. E-mail: campos.pmc@gmail.com

*Klebsiella pneumoniae* está entre os patógenos oportunistas mais comuns, associada tanto a infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) quanto a infecções comunitárias, em especial, infecções do trato urinário (ITU). A espécie expressa habilidade de adquirir e transferir genes que conferem resistência a antimicrobianos. Um importante mecanismo relacionado é a produção de enzimas, como  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) e carbapenemases, que promovem a degradação das drogas  $\beta$ -lactâmicas, classe mais frequentemente utilizada na prática clínica para tratamento de pacientes com IRAS e infecções comunitárias, inclusive ITU. Devido à relevância clínica de *K. pneumoniae*, à sua crescente associação com ITU comunitária e à disseminação de resistência antimicrobiana, propôs-se o desenvolvimento deste estudo, com o objetivo de avaliar a presença de *bla*<sub>KPC</sub>, *blasHV*, *blaCTX-M* e *blaTEM* em 273 amostras da bactéria isoladas de pacientes com ITU comunitária. O perfil de suscetibilidade antimicrobiana das amostras já havia sido previamente estabelecido. Inicialmente, extraiu-se o DNA por lise térmica e, em seguida, foi realizada PCR para pesquisa dos marcadores citados. Os resultados foram revelados por eletroforese em gel de agarose a 1%. Os genes *blasHV*, *blaCTX-M*, *blaTEM* e *blaKPC* foram detectados em 51,0%, 10,6%, 5,1% e 1,1% das amostras bacterianas, respectivamente. Entre elas, 17 albergavam dois genes e quatro carreavam três genes simultaneamente. Das 28 amostras que expressaram multirresistência, 26 apresentaram algum dos genes analisados, o que sugere que a produção de  $\beta$ -lactamases está relacionada ao perfil de resistência observado. No total, 161 amostras apresentaram ao menos um dos quatro genes avaliados, o que indica sua importância como marcadores de resistência carreados por *K. pneumoniae* associada à ITU comunitária. Tal achado contribui para o conhecimento da epidemiologia da doença no nosso meio e auxilia no estabelecimento de antibioticoterapia empírica.

**Palavras-chave:** *Klebsiella pneumoniae*, infecção urinária,  $\beta$ -lactâmicos, resistência antimicrobiana.

**Apoio Financeiro:** CNPq, CAPES, FAPEMIG e PRPq/UFMG.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 055**

### **PESQUISA DE INTEGRONS, CASSETES GÊNICOS E RESISTÊNCIA A DROGAS ANTIMICROBIANAS DE AMOSTRAS DE *Escherichia coli* RECUPERADAS DE ÁGUAS DE CONSUMO DA MESORREGIÃO DE BELO HORIZONTE.**

Ferreira, J. F. G<sup>1</sup>; Moreira, M<sup>1</sup>; Lanna, M.C.S<sup>2</sup>; Farias, L.M<sup>1</sup>; Magalhães, P. P<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios. Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG.

<sup>2</sup>Laboratório de Biologia e Tecnologia de Micro-organismos. Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, UFOP, Ouro Preto, MG.

E-mail: joaofgf\_@hotmail.com

A baixa qualidade microbiológica da água destinada ao consumo humano está associada a uma taxa de mortalidade anual de cerca de três milhões de pessoas. Um importante agente de doença diarreica é a espécie *Escherichia coli*. A plasticidade genotípica de *E. coli* resulta na grande variedade de patótipos da bactéria e no amplo e variado perfil de resistência a drogas antimicrobianas relatado em diferentes ambientes, incluindo o aquático. Considerando a relevância do tema, o presente estudo teve o objetivo de avaliar o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos, além da pesquisa de *integrons* e cassetes gênicos, de amostras de *E. coli* isoladas da água de abastecimento da mesorregião de Belo Horizonte durante o período de setembro de 2014 a dezembro de 2015. As amostras de *E. coli* recuperadas foram avaliadas quanto ao perfil de suscetibilidade a antimicrobianos pelo método de disco difusão. Além disso, estas amostras foram submetidas à extração de DNA, o qual foi utilizado para a pesquisa de *integrons* e cassetes gênicos por reação de polimerização em cadeia (PCR). Foram analisadas 1185 amostras de água de consumo das quais 92 (7,8%) estavam contaminadas com coliformes totais e 50 (4,2%) com *E. coli*. Um total de 445 amostras bacterianas foi identificado como *E. coli*. Nenhum dos 22 antimicrobianos utilizados foi eficaz contra todas as amostras testadas, sendo 164 (36,8%) amostras resistentes a pelo menos um antimicrobiano, 38 (8,5%) delas multirresistentes. A presença de *integrons* foi detectada em 18 (4,0%) amostras bacterianas, das quais duas possuem também cassetes gênicos. Estes resultados nos permitem concluir que parte das águas de consumo analisadas está atuando na disseminação de *integrons* e genes de resistência a antimicrobianos entre populações humanas.

**Palavras-chave:** *Escherichia coli*, resistência a antimicrobianos, *integrons*, cassetes gênicos, água de consumo.

**Apoio Financeiro:** CNPq, FAPEMIG, CAPES, PRPq/UFMG



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 056**

### **IMUNOGLOBULINAS-G INDUZIDAS PELA MICROBIOTA TRANSLOCAM PARA O LÚMEN INTESTINAL DURANTE A COLITE ULCERATIVA E TEM COMO ALVO TÁXONS DISBIÓTICOS.**

**Fagundes, M.**<sup>1,2</sup>; Batista, R. R. A.<sup>1,2</sup>, Teixeira, M. M.<sup>2</sup>, Souza, D. G.<sup>1</sup>, Fagundes C.T.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Interação Microrganismo-Hospedeiro, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG.

Sabe-se que anticorpos induzidos pela microbiota contribuem para a responsividade inflamatória do hospedeiro. Com isso, nesse trabalho buscamos avaliar se anticorpos induzidos pela microbiota poderiam estar envolvidos no controle da disbiose que ocorre durante a colite ulcerativa. Para isso, animais receberam, por via oral, uma solução de Dodecil Sulfato de Sódio (DSS) a 2% p/v por 9 dias. A colite ulcerativa leva a uma inflamação intestinal que tem pico 10 dias após a exposição ao DSS e que se resolve antes do dia 20 de início do protocolo. Ainda, a indução da colite leva a uma microbiota disbiótica, caracterizada pela expansão do grupo de bactérias da Família *Enterobacteraceae*. Interessantemente, essa expansão é mais duradoura que a inflamação intestinal, já que é detectada 5 dias após o início da colite, tem pico 10 dias após exposição ao DSS e dura até 20 dias após o início do protocolo, voltando à densidade populacional inicial apenas 30 dias após a indução da colite. Através das técnicas de ELISA, e FACS demonstramos que anticorpos circulantes induzidos pela microbiota são reativos a bactérias que expandiram durante a disbiose induzida pela colite ulcerativa. Ainda, demonstramos que há translocação de IgGs para o lúmen do intestino após a colite ulcerativa. Esses anticorpos se ligam a bactérias fecais e são reativos a enterobactérias isoladas das fezes de camundongos com colite ulcerativa. O aumento de IgG reativa a enterobactérias e ligadas a bactérias fecais é concomitante à expansão da população de enterobactérias e, quando essa cai, a quantidade de IgGs no lúmen também cai. Ainda, foi observado um aumento na quantidade e tamanho das placas de Peyer na mucosa do cólon, evento que precedeu a translocação de IgG para o lúmen intestinal durante a colite. Em conclusão, esses resultados nos permitem sugerir que IgGs se ligam às bactérias disbióticas e auxiliam no restabelecimento da homeostase microbiana intestinal após a colite ulcerativa.

**Palavras chave:** Microbiota, Disbiose, Enterobactérias, Anticorpos, Colite ulcerativa.

**Apoio Financeiro:** PRPq-UFMG, CNPq, INCT-Dengue e CAPES.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 057**

**VIABILIDADE DE BACTÉRIAS LÁTICAS EM POLPA DE CACAU CONGELADA**

GIL, P.O.<sup>1</sup>; ALBUQUERQUE, C.M.<sup>1</sup>; SILVA, A.L.<sup>1</sup>; GRANJEIRO, P.A.<sup>1</sup>; MAGALHÃES, J.T.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia Básica; Laboratório de Processos Biotecnológicos e Purificação de Macromoléculas, UFSJ, Divinópolis, MG, Brazil. E-mail: priscilaagil@gmail.com.

A matriz alimentar onde bactérias probióticas são adicionadas, o processamento e a forma de estocagem do alimento possuem papel decisivo na funcionalidade dos probióticos. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar a viabilidade de quatro cepas de bactérias láticas (BAL) de *Lactobacillus* sp, com potencial probiótico em polpa de cacau congelada durante três meses. As bactérias foram crescidas em caldo MRS por 24 horas a 37°C, lavadas e centrifugadas com 5ml PBS (pH 7,4) e cerca de  $10^8$  células/ml foram adicionadas nas polpas previamente pasteurizadas por 20 minutos. Os tubos foram imediatamente congelados a -20°C e as análises realizadas no momento da adição das bactérias e uma vez por mês, com três repetições. Os controles foram a polpa *in natura* e a polpa pasteurizada, ambas sem adição de bactérias láticas. A microbiota da polpa pasteurizada foi eliminada e a polpa *in natura* apresentou  $10^3$  células/ml no tempo zero. Após 30 dias de estocagem duas cepas tiveram redução de dois log no número de células e uma cepa 5 log. Com 60 dias somente uma cepa apresentou  $10^3$  células/ml, enquanto as outras apresentaram concentrações menores que esse valor. Após os 90 dias o número de sobreviventes para todas as cepas foi menor que  $10^3$  células/ml. A matriz alimentar deste estudo não foi capaz de proteger as bactérias acima de 30 dias de armazenamento a -20°C.

**Palavras chave:** Alimentos funcionais, Probióticos, Bactérias Láticas, polpa de fruta, cacau.

**Apoio financeiro:** CNPq, FAPEMIG, UFSJ



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 058**

### **SALMONELLA spp EM SUÍNOS: RISCOS DA TERMINAÇÃO AO PRODUTO FINAL**

Gomes<sup>1</sup>, R.S.; Cançado<sup>2</sup>, S.V.; Assis<sup>2</sup>, D.C.S.

<sup>1</sup>Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal- EV/UFMG, bolsista CNPQ. Email: [rafaelgomesvet@yahoo.com.br](mailto:rafaelgomesvet@yahoo.com.br)

<sup>2</sup>Professora- Departamento de Inspeção e Tecnologia de Produtos de Origem Animal- EV/UFMG

A salmonelose, causada pela *Salmonella* spp., é uma das principais doenças transmitidas por alimentos (DTA) e os produtos de origem animal, especialmente os obtidos de suínos e aves, têm sido frequentemente envolvidos nos surtos dessa doença em seres humanos. No caso dos suínos a via oro-fecal é considerada a principal na transmissão e as tonsilas e linfonodos submandibulares são a porta de entrada para os animais. A ração, a água e a presença de roedores nas granjas produtoras são consideradas as principais fontes de risco para os suínos que se contaminam e podem excretar a bactéria no ambiente. A fase final de criação e engorda (terminação) na granja é o ponto crítico de contaminação dos lotes pois nesse período os animais são criados em altas densidades o que possibilita a contaminação entre eles e dificulta o controle. Animais aparentemente saudáveis, porém portadores assintomáticos, representam risco durante o transporte e fase pré-abate no frigorífico pois o estresse que os suínos são submetidos nesta fase favorece a excreção do micro-organismo nas fezes contaminando as baías de espera. As etapas do abate também são risco potencial de contaminação cruzada, sendo que a escaldade, a depilação e a evisceração podem promover o aumento da contaminação nas carcaças, que quando utilizadas na fabricação de embutidos podem ser responsáveis pela presença de *Salmonella* spp. nos produtos finais, especialmente aqueles do tipo frescal que não passam por tratamento térmico na indústria e podem chegar contaminados ao consumidor. De acordo com a legislação brasileira, a presença de qualquer sorovar de *Salmonella* spp. em alimentos é motivo para classificá-los como impróprios para consumo. Dessa maneira, é fundamental que novos estudos atualizem os dados de risco e prevalência, tanto em rebanhos suínos, como também no frigorífico, nas estações pré-abate, linha de abate, até o produto final, para que programas de controle possam ser implementados e aplicados.

**Palavras-chave:** *Salmonella*, doenças transmitidas por alimentos, suínos, abate.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 059**

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE BRINQUEDOS DE UMA BRINQUEDOTECA DA ALA PEDIÁTRICA EM UM HOSPITAL ESCOLA NO SUL DE MINAS GERAIS**

Lage, F.S.<sup>1</sup>; Andrade, M.C.<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Acadêmica do terceiro ano de medicina da Faculdade de Medicina de Itajubá, MG. <sup>2</sup>Professora titular das matérias: microbiologia, parasitologia e imunologia básica na Faculdade de Medicina de Itajubá, MG. E-mail: [fernanda.slage@hotmail.com](mailto:fernanda.slage@hotmail.com)

**Introdução:** Crianças hospitalizadas apresentam-se ainda mais suscetíveis à infecções devido a fatores como doença de base e ao processo de internação. Brinquedos de uso comum são potenciais fontes de contaminação e o compartilhamento de brinquedos entre crianças hospitalizadas favorece o processo de contaminação cruzada, podendo aumentar a transmissão de doenças nessa população de risco. Alguns microrganismos podem permanecer viáveis por horas e até semanas numa superfície, quando não adequadamente limpa e desinfetada. Deste modo, brinquedos podem funcionar como reservatório de microrganismos potencialmente patogênicos e multirresistentes. **Metodologia:** Foram analisadas amostras bacteriológicas obtidas de 40 diferentes tipos de brinquedos, coletadas em swab umedecido em solução fisiológica, e mantidas sob refrigeração. As amostras foram crescidas em meio enriquecido BHI e, em seguida, plaqueadas em meios ágar nutritivo, macconkey e manitol. Houve crescimento de bactérias no meio não seletivo ágar nutritivo, e, sem seguida, as colônias serão caracterizadas fenotipicamente quando ao formato, cor, presença ou ausência de brilho e a presença ou ausência de goma. Após a caracterização fenotípica, serão isoladas algumas colônias para realização do antibiograma. **Resultados:** Os resultados parciais demonstram crescimento de colônias nas 40 amostras plaqueadas em ágar nutritivo e manitol, mas nenhum crescimento nos meios seletivo macconkey. **Conclusões:** Os resultados parciais demonstram crescimento bacteriano nas amostras coletadas da brinquedoteca, com presuntivo crescimento de *Staphylococcus spp.* o que ainda será confirmado com testes mais específicos.

**Palavras-chave:** Análise Microbiológica; Brinquedoteca; Pediatria

**Apoio Financeiro:** FAPEMIG



## **RESUMOS**

**Número: 060**

### **EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO SUB-INIBITÓRIA DE CLINDAMICINA, METRONIDAZOL E PIPERACILINA/TAZOBACTAM NA MORFOLOGIA E CURVA DE CRESCIMENTO DE *Bacteroides fragilis* RECUPERADOS DE INFECÇÕES INTRA-ABDOMINAIS.**

Menezes, M. A.; Silva, C. L.; Costa, P. S.; Macedo, L. M.; Santos, S. G.

<sup>1</sup>Laboratórios de Microbiologia Oral e Anaeróbios, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte.

*Bacteroides fragilis*, que representa apenas 0,5% da microbiota do cólon humano, é o patógeno anaeróbio mais frequentemente recuperado de infecções intra-abdominais (IIA), devido aos seus fatores de virulência. Os antimicrobianos clindamicina, metronidazol e piperacilina/tazobactam são utilizados no tratamento de doenças infecciosas envolvendo *B. fragilis*, sendo que, em concentrações sub-inibitórias (sub-CIM) são potencialmente capazes de interferir de forma positiva ou negativa na virulência dessas bactérias. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da sub-CIM destes três antimicrobianos na morfologia e curva de crescimento de *B. fragilis*. Foram incluídas, duas amostras clínicas de *B. fragilis* isoladas de pacientes com IIA, atendidos em diferentes instituições de Belo Horizonte, além de uma amostra de referência. As amostras foram semeadas em meio de cultura sem antimicrobiano e com  $\frac{1}{2}$  da concentração inibitória mínima (CIM) de piperacilina/tazobactam e  $\frac{1}{4}$  da CIM de clindamicina e metronidazol. Foi feita a coloração de Gram das colônias crescidas nesses meios e observou-se a presença de células filamentosas, principalmente das amostras provenientes dos meios com sub-CIM de piperacilina/tazobactam e metronidazol, provavelmente devido à atuação dos antimicrobianos nas enzimas responsáveis pela divisão celular. Além disso, foram realizadas as curvas de crescimento das amostras na presença e ausência de sub-CIM, demonstrando um atraso de 15, 36 e 54 horas para o início da fase log de crescimento das amostras cultivadas em meio com sub-CIM de metronidazol; um atraso de 9, 30 e 33 horas das amostras com sub-CIM de clindamicina; e não houve atraso significativo das amostras com sub-CIM de piperacilina/tazobactam, porém, na presença de sub-CIM dos três antimicrobianos, houve diminuição da densidade de células. Estes achados, apesar de parciais, sugerem que a terapia antimicrobiana inadequada pode provocar diferentes interações entre o hospedeiro e a bactéria.

**Palavras chave:** *Bacteroides fragilis*, antimicrobianos, concentrações sub-inibitórias

**Apoio financeiro:** Fapemig; Capes; CNPq; PRpq/UFMG



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 061**

### **POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE COMPOSTOS NATURAIS E SINTÉTICOS CONTRA *Streptococcus agalactiae***

Palumbo, J.M.C.<sup>1</sup>; Lima, W.G.<sup>1</sup>; Cruz, W.S.<sup>1,2</sup>; Nascimento, L.A.A.<sup>1</sup>; Andrade, J.T.<sup>1</sup>; Ferreira, J.M.S.<sup>1</sup>, Magalhães, J.C.<sup>2</sup>; Soares, A.C.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia Médica, UFSJ, Divinópolis, MG. <sup>2</sup>Laboratório de Biologia Molecular e Celular, Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos (DQBIO), UFSJ, Ouro Branco, MG.

<sup>3</sup>Laboratório de Farmacologia da dor e Inflamação, UFSJ, Divinópolis, MG. julianapalumbo@yahoo.com.br

*Streptococcus agalactiae* é uma bactéria Gram-positiva que coloniza adultos saudáveis de maneira assintomática. No entanto, esta bactéria pode, em algum momento, devido a uma baixa de imunidade causar infecções. O tratamento com os antibióticos usuais vem se mostrando ineficiente e, neste contexto, o estudo de compostos sintéticos e naturais que apresentam atividades antibacterianas é de extrema importância para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Desse modo, o presente trabalho tem o objetivo de avaliar a atividade antibacteriana de compostos naturais e sintéticos contra *S.agalactiae*. Uma quimioteca de 25 compostos (24 sintéticos e 1 natural) foi empregada no estudo. A atividade antibacteriana foi determinada pela concentração inibitória mínima (CIM) segundo o método de microdiluição em caldo. Os compostos ativos seguiram para a determinação da atividade bactericida pela avaliação da concentração bactericida mínima (CBM). Amoxicilina e DMSO foram empregados como controles positivo e negativo, respectivamente. Quatro compostos apresentaram atividade antibacteriana no ensaio preliminar: B<sup>PRR</sup> (CIM 250 µg/mL); B<sup>BUR</sup> (CIM 62,5 µg/mL); B<sup>VAR</sup> (CIM 125 µg/mL) e B<sup>HXR</sup> (CIM 125 µg/mL). Desses compostos, o B<sup>BUR</sup> também apresentou efeito bactericida (CBM 250 µg/mL). A amoxicilina, por sua vez, apresentou alta atividade (CIM 0,9 µg/mL e CFM 3,9 µg/mL) e o DMSO não inibiu o crescimento do *S. agalactiae*, conforme o esperado. Em suma, os compostos B<sup>PRR</sup>, B<sup>BUR</sup>, B<sup>VAR</sup> e B<sup>HXR</sup> destacam-se como potenciais protótipos de antibióticos contra *S. agalactiae*, por apresentarem boa atividade, mas são necessários novos estudos, para potencializar sua atividade.

**Palavras-Chaves:** Atividade antibacteriana, *Streptococcus agalactiae*, Compostos sintéticos.



## **RESUMOS**

**Número: 062**

### **INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE ESPÉCIES DE BERBERIDACEAE**

**Rocha, M.P.<sup>1</sup>; Campana, P.R.V.<sup>2</sup>; Almeida, V.L.<sup>2</sup>; Silva, C.G<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Biotecnologia Vegetal, FUNED, Belo Horizonte, MG. <sup>2</sup>Serviço de Fitoquímica e Prospecção Farmacêutica, FUNED, Belo Horizonte, MG. E-mail: [procha.marina@gmail.com](mailto:procha.marina@gmail.com)

A resistência das bactérias aos antibióticos disponíveis se tornou um grave problema de saúde pública em todo mundo, pois além da dificuldade no tratamento das doenças bacterianas, cabe ressaltar o alto custo que onera os sistemas públicos de saúde. Neste contexto, faz-se necessário implantar estudos para identificar novos antibióticos farmacologicamente úteis para contribuição na farmacoterapia de doenças microbianas. A investigação de produtos naturais com atividade antimicrobiana representa uma importante alternativa para descoberta e desenvolvimento de novos agentes. Espécies da família Berberidaceae são uma fonte para a obtenção de novas substâncias bioativas, que podem contribuir na busca de novos agentes antibióticos. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibacteriana de extratos etanólicos de raízes e folhas de *D. cymosa* bem como de raízes e rizomas de *P. hexandrum* frente à *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 11775) pelo método de microdiluição em caldo, segundo NCCLS M7-A6 (2003) com adaptações. Nenhum dos extratos avaliados na concentração de 1 mg/mL apresentaram inibição significativa de *E. coli*. Em relação à bactéria *S. aureus*, os extratos de *D. cymosa* mostraram %I de 38±10 (folhas) e 56,1±10 (raízes). O extrato de raízes e rizomas de *P. hexandrum* apresentou %I 56,8±7,3. A caracterização química dos extratos vegetais, foi realizada por CLAE-FR-DAD. Nos perfis cromatográficos, foi possível evidenciar maior quantidade de substâncias de diferentes polaridades nos extratos de *D. cymosa*. No extrato de *P. hexandrum*, pode-se observar uma substância majoritária de polaridade média. O estudo fitoquímico dessas espécies, poderão contribuir com o isolamento de substâncias com a capacidade de inibição de *S. aureus*, uma bactéria de grande importância na clínica. O estudo químico associado ao de atividade biológica amplia o conhecimento sobre os extratos vegetais, visando a pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos.

**Palavras-chaves:** *Podophyllum hexandrum*, *Diphylleia cymosa*, atividade antimicrobiana, Berberidaceae, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

**Apoio financeiro:** CNPq e FUNED.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 063**

### **DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS BETALACTÂMICOS E INVESTIGAÇÃO FENOTÍPICA DA PRODUÇÃO DE ENZIMA BETALACTAMASE EM AMOSTRAS DE *Escherichia coli* RECUPERADAS DE UM RIO DA REGIÃO CENTRO-OESTE DE MINAS GERAIS**

Jesus, M.L<sup>1</sup>; Simião, D.C<sup>2</sup>.; Dorim, P.H.G<sup>2</sup>.; Paiva, M.C.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Microbiologia Clínica da UFSJ/Campus Dona Lindu – Divinópolis-MG.  
E-mail:larissajesus.95@outlook.com

*Escherichia coli*, sobrevive em ampla variedade de hospedeiros e ambientes e podem ser patogênica para o ser humano. Para o tratamento de infecções causadas por esta espécie, destaca-se o uso dos betalactâmicos, mas o surgimento da resistência vem comprometendo o uso clínico destes compostos. Dentre os mecanismos de resistência descritos, destaca-se o mecanismo enzimático. Betalactamases, tais como Enzimas Betalactamases de Espectro Estendido (ESBL), Enzima betalactamase induzível (AmpC) e Carbapenemases tipo KPC são de grande impacto clínico, uma vez que inativam os agentes betalactâmicos. Fora do contexto clínico, o ambiente natural tem sido destacado como importante no surgimento e disseminação da resistência bacteriana. *E.coli* (n=32) recuperadas de águas do Rio Pará-MG e pertencentes a bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Clínica da UFSJ foram estudadas. O perfil de susceptibilidade dos isolados a oito betalactâmicos foi determinado e interpretado pela técnica de difusão em ágar de acordo com *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2017). Os procedimentos para determinação fenotípica da produção de ESBL e KPC seguiram as orientações do CLSI (2017), enquanto para AmpC foram conduzidos segundo Elsayed e colaboradores (2015). Um alto perfil de sensibilidade aos betalactâmicos (>65,6%) foi verificado entre os isolados. No entanto, *E. coli* resistentes e com resistência intermediária (11/32) a amoxicilina/ácido clavulânico foram observados. Além disso, (8/32) e (4/32) dos isolados foram resistentes a cefoxitina e meropenem, respectivamente. Nenhum isolado de *E. coli* apresentou resultado positivo nos testes para detecção das betalactamases. A ausência da produção de betalactamase pelos isolados sugere uma limitada disseminação deste mecanismo de resistência no ambiente estudado. Os dados obtidos alertam para a importância do monitoramento da resistência bacteriana em ambientes não clínicos, visando conter a disseminação da resistência bacteriana.

**Palavras-chaves:** *E. coli*, betalactâmicos, betalactamases, rio.

**Apoio financeiro:** FAPEMIG



## RESUMOS

Número: 064

### THE ONE HEALTH CONCEPT AND FOOD (SPICES) QUALITY MONITORING PROGRAMS

LEAL BERNARDES, A. F<sup>1</sup>; FAÚLA, L. L.<sup>1</sup>; SOARES, A. C. C.<sup>1</sup>; FREITAS, D. L.<sup>2</sup>CARLOS, G. A.<sup>1</sup>

1- FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS, BELO HORIZONTE, MG (RUA CONDE PEREIRA CARNEIRO, 80, CEP: 30510-010, BELO HORIZONTE – MG, BRAZIL); 2- UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, MG (Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha - Belo Horizonte – MG CEP 31270-901). E-mail: andre.leal@funed.mg.gov.br

The One Health Concept began to gain strength by the end of the 20th century, mainly based on discussions in various science spheres. From that time on, public policies, in order to implement it the best possible way, have undergone several adaptations in their scope and extension. In this sense, health services (promotion, protection and recovery) become part of the human rights list, and must be provided positively by the State. In this context, national and state programs for monitoring the quality of food consumed by the population are inserted. Samples of these foods are collected by the Sanitary Surveillance, or other inspection institution, and forwarded to the Public Health Laboratories to analyze the levels of microbiological tolerance established by current legislation (RDC N°. 12/2001 MS). In Minas Gerais, the Food Microbiology Laboratory, Funed, participates in health surveillance programs conducting microbiological analysis. Between 2013 and 2014, 69 spice samples (black pepper and oregano) were analysed at Funed using the methodologies described by AOAC Official Method 2005.03 and Arlington *et al.*, 2014. Of these, 11.6% (n= 8) presented unsatisfactory results according to the legislation. *Escherichia coli* was involved in 75% (n = 6) of the rejections and *Salmonella sp* in 50% (n = 4). In a similar study, conducted by Vieira *et al.*, 2009, about 30% of spices (black pepper and oregano) presented unsatisfactory hygienic-sanitary conditions. It is tempting to associate the decrease of unsatisfactory samples with the strengthening of the microbiological food monitoring programs practiced in Minas Gerais. Therefore, the importance of programs to monitor the quality of consumed food, as one of the ways of control of food-borne diseases, is emphasized. In addition, monitoring actions associated with the Single Health context may help subsidize public policy actions aiming the protection, promotion and recovery of collective health.

**Keywords:** Food Quality Monitoring Programs, Health Concept, foodborne disease.

**Financial support:** CAPES, FAPEMIG, CNPq, PRPq UFMG



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 065**

### **AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DE EXTRATO DA BEBIDA KEFIR SOBRE CULTURAS DE *Listeria monocytogenes***

Mendes, G.<sup>1</sup>; Lara Júnior, C. R.<sup>1</sup>; Oliveira, R. B. P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Microbiologia Industrial e Biocatálise, Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: grazielamendes11@gmail.com

Kefir é uma bebida obtida através da fermentação a partir de grãos de kefir em leite ou água. Os grãos são formados por uma matriz polissacarídica que contém diversos microrganismos, dentre eles, as bactérias ácido-lácticas, que apresentam conhecido efeito probiótico. A partir da fermentação do leite pelos grãos, foram obtidos sobrenadantes centrifugados (SC) e sobrenadantes centrifugados filtrados (SCF), através da separação de fases do leite fermentado, seguida da centrifugação e filtração da fase líquida. Os SC e SCF foram avaliados quanto à sua atividade inibitória indireta sobre a bactéria patogênica *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115) sorotipo 4b, através dos métodos de difusão em discos e em poços. As diluições do cultivo de *L. monocytogenes* foram adicionadas em placas de Petri, que em seguida receberam o meio BHI ágar. Em seguida foram aplicados discos de papel embebidos nos SC ou SCF quando o método foi o de difusão em discos. Quando o método adotado foi o de difusão em poços, os poços foram feitos com auxílio de ponteiras estéreis e preenchidos com os SC ou SCF. As placas foram então incubadas em estufa a 37°C por 24-48 hs. Os halos de inibição obtidos foram medidos com auxílio de paquímetro e avaliados estatisticamente através da Análise de Variância (ANOVA). Não foi observada inibição do crescimento de *L. monocytogenes* pelos SC e SCF testados através do método de difusão em discos. Entretanto, nos testes realizados a partir do método de difusão em poços houve a formação de halos de inibição após a incubação das placas por 48 hs. A média dos halos de inibição obtidos foi de  $5,76 \pm 1,33$  mm, resultado similar aos encontrados na literatura. Assim, pode-se concluir que na bebida kefir existem metabólitos bacterianos que apresentam efeito antimicrobiano sobre *L. monocytogenes*. Esses resultados são promissores e indicam uma possibilidade futura de se utilizar a bebida como alternativa de tratamento para infecções bacterianas ou como conservante em alimentos.

**Palavras-chave:** Kefir; *Listeria monocytogenes*; efeito antimicrobiano; método de difusão em discos; método de difusão em poços; bacteriocinas.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 066**

### **ASSENTAMENTO DOIS DE JULHO, INVESTIGAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE COLIFORMES E INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO**

Beatriz Paulino Moreira<sup>1</sup> ([beatrizmoreira.pm@gmail.com](mailto:beatrizmoreira.pm@gmail.com)), Nathalha do Carmo<sup>1</sup> ([nathalhacarmo@gmail.com](mailto:nathalhacarmo@gmail.com)), Priscila Gomes Camillozzi<sup>1</sup> ([pricamillozzi@hotmail.com](mailto:pricamillozzi@hotmail.com)), Scarlat Karoline Lopes<sup>1</sup> ([scarlatkaroline@gmail.com](mailto:scarlatkaroline@gmail.com)), Juliana Campos de Pinho Resende<sup>1</sup> ([juresende@pucminas.br](mailto:juresende@pucminas.br)), Marcus Vinicius Campos Tolentino<sup>2</sup> ([mvtolentinno@gmail.com](mailto:mvtolentinno@gmail.com)).

<sup>1</sup> Departamento de Ciências Biológicas, <sup>2</sup>Departamento de Química- Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais Campus Betim, Rua do Rosário, 1081, Bairro Angola, Betim, Minas Gerais, CEP32604-115.

A água é substância vital à manutenção de todas as formas de vida e, quando não devidamente manipulada e tratada, pode transformar-se em uma potencial via de transmissão de patologias. Assim, a verificação da qualidade desta, através de testes, faz-se indispensável à promoção da saúde. A análise microbiológica é um importante indicador de qualidade de água, dado que a presença de Coliformes Totais e *Escherichia coli* indicam contaminação da mesma. A presença desses microrganismos pode acarretar diarreias, vômitos, em casos mais graves desidratação e até mesmo óbito aos indivíduos que estiverem expostos à água infectada por excretas humanas ou animais. O objetivo do trabalho foi verificar a qualidade microbiológica da água para o uso da população e aplicação na agricultura e nos demais afazeres domésticos. Duas amostras foram colhidas no mês de maio de 2016 no Assentamento Dois de Julho, localizado na Rodovia MG 050, em Vianópolis. Estas foram analisadas utilizando-se do teste Colilert. Obteve-se resposta positiva para coliformes totais e para coliformes fecais, sendo que, para coliformes fecais, especificamente a *Escherichia coli*, o teste apresentou NMP igual a 108.1(UFC/mL), resultado inferido após a observação da fluorescência em 43 poços grandes e 7 poços pequenos na cartela do kit para o teste. A partir de tais dados, nota-se nível alto de contaminação, inviabilizado a manipulação da água para consumo como dispõe a Portaria 518/2004 do Ministério da Saúde, onde a presença de *E. coli* deve ser ausente em 100mL de agua analisada, evidenciando a eminent necessidade do Estado tomar as atitudes cabíveis de modo a possibilitar e viabilizar o uso desta fonte hídrica.

**Palavras-chave:** Assentamento, coliformes, Colilert.

**Apoio financeiro:** Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais – campus Betim.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 067**

### **OCORRÊNCIA DE INTEGRONS EM AMOSTRAS DE *Escherichia coli* DIARREIOGÊNICA E ESPÉCIMES FECAIS DE CRIANÇAS COM E SEM DOENÇA DIARREICA**

Oliveira, P.L.<sup>1</sup>; Silva, C.P.<sup>1</sup>; Oliveira, A.G.G.<sup>1</sup>; Paula, C.S.<sup>2</sup>; Mendes, E.N.<sup>2</sup>; Nascimento, A.M.A.<sup>3</sup>; Farias, L.M.<sup>1</sup>; Magalhães, P.P.<sup>1</sup>. E-mail: [patriciaoliveira@yahoo.com.br](mailto:patriciaoliveira@yahoo.com.br)

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG; <sup>2</sup>Laboratório de Diagnóstico Genético de Doenças Infecciosas, Departamento de Propedêutica Complementar, Faculdade de Medicina, UFMG, Belo Horizonte, MG;

<sup>3</sup>Laboratório Genética de Microrganismos, Departamento de Genética, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG.

Os membros da espécie *Escherichia coli* podem ser agrupados em dois grandes grupos, amostras da microbiota indígena e amostras exógenas, mais frequentemente associadas à etiopatogenia de doenças, entre elas, doença diarreica aguda. A resistência a antimicrobianos é um enorme problema de saúde pública. Os genes que codificam a propriedade podem estar inseridos em *integrons*, unidades genéticas eficientes em capturar e promover a expressão gênica. O objetivo deste estudo foi caracterizar *integrons* em amostras de *E. coli* diarreogênica (ECD) e membros da microbiota indígena (EMI), bem como avaliar a presença de *integrons* em espécimes fecais de crianças com ou sem doença diarreica. O grupo de estudo incluiu 170 amostras bacterianas: 92 ECD (57 ETEC e 41 EPEC) e 72 EMI. Também incluiu 40 espécimes fecais de crianças com (20) e sem (20) diarreia. A pesquisa de *integrons* classe 1, 2 e 3 em *E. coli* foi realizada por PCR. Em amostras positivas, foi investigada a presença de cassetes gênicos. Produtos de amplificação de cassetes gênicos foram sequenciados para avaliar a presença de genes que conferem resistência antimicrobiana. As amostras bacterianas também foram submetidas a antibiograma. *Integrons* classes 1, 2 e ambas as classes foram detectadas em 20,6%, 7,1% e 2,4% das amostras, respectivamente. *Integron* classe 3 não foi observado. Foram detectados genes que conferem resistência a β-lactâmicos, estreptomicina, espectinomicina, trimetoprima e estreptotricina. Os espécimes fecais, por sua vez, foram submetidos a qPCR para quantificação de Bacteria, *int1*, *int1* clínico e *int2*. Independentemente do grupo de estudo, foram encontrados, aproximadamente, 10<sup>9</sup> cópias de cada marcador de integrase por grama de fezes. Todas as amostras de fezes albergavam *integrons*. Em conjunto, os resultados destacam a importância dos *integrons* e da microbiota indígena como reservatório e na disseminação da resistência bacteriana e enfatizam a necessidade de procedimentos que controlem este processo.

**Palavras-chave:** *Escherichia coli*, diarreia aguda, resistência antimicrobiana, *integron*, cassette gênico.



## **RESUMOS**

**Número: 068**

### **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE E VERMELHA E SUA POSSÍVEL APLICAÇÃO NO CONTROLE DE LEVEDURAS**

Freitas, M.C.D.<sup>1</sup>; Finamore, L.<sup>2</sup>; Almeida, B.M.<sup>3</sup>; Almeida, J. J.<sup>3</sup>; Johann, S. <sup>4</sup>; Figueiredo, S.M.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Mestrado em saúde e Nutrição, Escola de Nutrição, UFOP, Ouro Preto, MG; <sup>2,4</sup>Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG; Pharma Néctar, Caeté, MG; Departamento de Alimento e Dietética, UFOP, Ouro Preto, MG. Email: marciadornelas.ipanema@yahoo.com.br

A própolis, vêm se destacando por suas propriedades biológicas e farmacológicas, e por sua atividade antifúngica. Infecções fúngicas são importantes causas de morbidade e mortalidade mundial. A candidíase é uma infecção causada por leveduras do gênero *Candida* e essa infecção têm aumentado nos últimos tempos principalmente pelo aumento de pacientes imunocomprometidos. Outra infecção fúngica de grande importância clínica é a criptococose, causada por *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*. A criptococose causa anualmente mais de 625.000 mortes. No presente trabalho objetivou-se verificar a atividade antifúngica de cápsulas, extratos seco de própolis verde em diferentes concentrações e o extrato seco de própolis vermelha da região de Caeté - Minas Gerais. Os diferentes extratos foram testados contra *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. neoformans* e *C. gattii*, todas da *American Type Culture Collection (ATCC)*. Além destas foram utilizados 12 isolados clínicos de *C. albicans*, todos provenientes da coleção de Microorganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Para o teste de atividade antifúngica foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) capaz de inibir em no mínimo 50% do crescimento fúngico em relação ao controle de crescimento. Observou-se que os extratos da própolis vermelha à 25% e da própolis verde à 100% foram eficazes contra todas as leveduras testadas. Interessantemente os isolados clínicos de *C. albicans* resistentes ao fluconazol apresentaram susceptibilidade aos extratos das própolis vermelha à 25% e da própolis verde à 100%. Todos os extratos (extrato de própolis verde à 20%, 28%, 50% e 100%, extrato de própolis vermelha à 25% e cápsula 28% e 50%) foram eficazes contra *C. krusei*, *C. neoformans* e *C. gattii*. Este estudo contribuirá para a viabilização do emprego profilático e terapêutico de extratos de própolis na melhoria da qualidade de vida de pacientes portadores de candidíases.

**Palavras chave:** Própolis verde, Própolis vermelha, *Candida*, *Cryptococcus*.

**Apoio financeiro:** Pharma Nectar; CAPES.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 069**

**ATORVASTATINA EXIBE EFEITO ANTIFÚNGICO CONTRA AS LEVEDURAS DOS GÊNEROS *Candida*, *Rhodotorula* e *Saccharomyces***

Lima, W.G.<sup>1</sup>; Cruz, W.S.<sup>1,2</sup>; Andrade, J.T.<sup>1</sup>; Nascimento, L.A.A.<sup>1</sup>; Ferreira, J.M.S.<sup>1</sup>, Magalhães, J.C.<sup>2</sup>; Soares, A.C.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia Médica, UFSJ, Divinópolis, MG. <sup>2</sup>Laboratório de Biologia Molecular e Celular, Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos (DQBIO), UFSJ, Ouro Branco, MG.

<sup>3</sup>Laboratório de Farmacologia da dor e Inflamação, UFSJ, Divinópolis, MG. #williamgustavofarmacia@hotmail.com.

Infecções fúngicas causadas por leveduras multirresistente estão se tornando cada vez mais comuns e vem estimulando a busca urgente de novos antifúngicos. A atorvastatina, um conhecido hipocolesterolêmico, destaca-se em alguns trabalhos devido ao seu efeito antibacteriano, mas limitadas informações estão disponíveis sobre o seu potencial antifúngico. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antifúngico da atorvastatina contra comuns e raras leveduras associadas a micoses superficiais e sistêmicas. A atividade antifúngica foi avaliada pela concentração inibitória mínima (CIM) utilizando o método de microdiluição em caldo Sabouraud-Dextrose. As espécies empregadas no estudo foram: *Candida albicans* SC5314, *C. glabrata* ATCC2001, *C. krusei* ATCC34135, *C. tropicalis* ATCC28707, *Cryptococcus neoformans* ATCC208821, *Rhodotorula glutinis* ATCC90392 e *Saccharomyces cerevisiae* ATCC9763. Oito isolados clínicos de *C. albicans* e 5 de *C. dubliniensis* foram também incluídos neste estudo. Cetoconazol e DMSO foram usados como controle positivo e negativo, respectivamente. Atorvastatina apresentou CIM de 8 $\mu$ g/mL contra *R. glutinis*, 32 $\mu$ g/mL contra *C. albicans* e *C. glabrata*; 256 $\mu$ g/mL contra *C. tropicalis*; 512 $\mu$ g/mL contra *S. cerevisiae* e foi inativa (>512  $\mu$ g/mL) contra *C. krusei* e *C. neoformans*. Para *C. albicans* SC5314, a atorvastatina apresentou atividade 16 vezes mais potente que o antifúngico cetoconazol (CIM >512  $\mu$ g/mL). Similarmente, em isolados clínicos de *C. albicans*, a atorvastatina manteve potente atividade (CIM na faixa de 16 a 64 $\mu$ g/mL), mas foi menos efetiva contra *C. dubliniensis* (CIM na faixa de 128 a >512  $\mu$ g/mL). Esses resultados mostram que a atorvastatina apresenta um potente efeito antifúngico e sugerem seu reposicionamento para a terapia antifúngica.

**Palavras-Chaves:** Atorvastatina, Atividade antifúngica, Leveduras patogênicas, Reposicionamento de fármaco.

**Apoio financeiro:** FAPEMIG.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 070**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE TRATAMENTOS CASEIROS CONTRA AGENTES DA ONICOMICOSE**

Mafra, L. X.<sup>1</sup>; Carmo, P. H. F.<sup>2</sup>; de Oliveira, M. D.<sup>1</sup>; Beltrami, V. A.<sup>1</sup>; Alexandre, C. H.<sup>1</sup>; Martins, F. R. B.<sup>1</sup>; e Silva, P. H. B.<sup>1</sup>; Resende-Stoianoff, M. A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduando do Curso de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil; <sup>2</sup>Laboratório de Micologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: lucasxmafра@gmail.com

As onicomicoses são micoses causadas por fungos que afetam as unhas, sendo infecções de alta incidência e difícil tratamento. Dentre os fungos isolados dessas infecções, estão os dermatófitos *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton interdigitale* e, eventualmente, a levedura *Candida albicans*. Na prática popular, é comum o uso de compostos caseiros, na tentativa de resolução das micoses causadas por esses microrganismos. O potencial antifúngico de substâncias populares de uso caseiro contra onicomicoses, como o óleo de coco extra virgem, o vinagre de maçã e o suco de limão, foi testado por meio da concentração inibitória mínima (CIM) contra linhagens de *Trichophyton rubrum*, *T. interdigitale* e *Candida albicans*. Devido aos resultados encontrados, o ácido acético também foi testado posteriormente. Determinou-se ainda a concentração fungicida mínima (CFM) dessas linhagens frente ao ácido acético. O CIM foi maior que 50% (% v/v) para o óleo de coco e o suco de limão frente às espécies avaliadas; de 25% (% v/v) para *C. albicans* e 12,5% (% v/v) para os dermatófitos, quando utilizado o vinagre de maçã. Já o ácido acético apresentou CIM de 0,3% (%v/v) para *T. rubrum* e *T. interdigitale* e 0,7% (% v/v) para *C. albicans*, resultado extremamente positivo se comparado às drogas utilizadas no tratamento dessas micoses (CIM de 0,6 µg/mL de fluconazol para *C. albicans* e de 0,03 µg/mL de itraconazol para dermatófitos). Para *C. albicans*, a CFM foi igual ao MIC, o que sugere ação fungicida do ácido acético na concentração de 0,7% (% v/v). Diante dos resultados, concluiu-se que o vinagre de maçã possui eficácia significativa contra os agentes testados. Acredita-se que a ação antifúngica é devido à presença de ácido acético como um dos componentes dessa substância. Estudos posteriores irão avaliar a capacidade de penetração do ácido acético na camada de queratina da unha, o que poderia dar indícios da viabilidade do uso dessa substância em terapias antifúngicas.

**Palavras-chave:** Onicomicose, Dermatófitos, *Candida albicans*, Óleo de coco, Vinagre de maçã, Suco de limão, Antifúngico, Tratamento caseiro, Ácido acético.

**Apoio Financeiro:** CNPq, FAPEMIG, CAPES.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 071**

### **AVALIAÇÃO DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À *Aspidosperma* sp. FRENTE À *Escherichia coli* (ATCC 11775) E POTENCIAL ANTIMICROBIANO**

Coelho, A.P.G.<sup>1</sup>; Campana, P.R.V.<sup>1</sup>; Silva, C.G.<sup>1</sup>; Almeida, V.L.<sup>1</sup>; Silva, A.F.<sup>2</sup>; Scoaris, D.O<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Serviço de Fitoquímica e Prospecção Farmacêutica; Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Brasil; <sup>2</sup> Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil. E-mail: ana.coelho@funed.mg.gov.br

A Organização Mundial da Saúde (OMS) aponta que 90% dos isolados de espécies bacterianas, apresentam resistência a antimicrobianos de primeira escolha, o que representa desafios a terapêutica. A espécie *Escherichia coli* é responsável por infecções no trato urinário e doenças alimentares graves. Apresenta mecanismos de resistência frente a quase todos os antibióticos conhecidos, o que motiva a busca por novas substâncias, com amplo aspecto de atividade e novos mecanismos de ação. A associação de fungos endofíticos e plantas medicinais tem demonstrado resultados promissores na obtenção de substâncias com atividade antimicrobiana. Neste trabalho, foi realizada a avaliação da atividade antimicrobiana de fungos endofíticos obtidos de uma espécie de *Aspidosperma* frente à *E. coli*. Foram amostrados 375 fragmentos das folhas de *Aspidosperma* sp. coletadas em janeiro/2015, sendo isolados 117 morfotipos fúngicos. Os isolados foram preservados pela técnica de Castellani e criopreservação (-80°C). Para extração, foi realizado o cultivo em placas de BDA a 25°C por 15 dias. Após crescimento, o meio de cultura com o micélio foi transferido para tubos contendo 30 mL de etanol P.A., sendo mantidos a 10°C por 48h. Após este período, o sobrenadante foi removido, filtrado, seco em centrífuga a vácuo e armazenado a 4°C. Para análise das amostras, foi empregada a técnica de microdiluição em caldo. A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada com 114 (97,4%) extratos dos isolados, uma vez que 3 (2,5%) foram descartados da análise, por não crescerem após cultivo. Os resultados demonstraram ser promissores para a atividade antimicrobiana frente à *E. coli*. Entre os 114 extratos avaliados, 21 (18,42%) inibiram acima de 50% e 6 (5,27%) acima de 60%. Estes resultados sugerem que os extratos de fungos endofíticos associados às espécies de *Aspidosperma* podem apresentar atividade antimicrobiana frente à bactéria Gram-negativa.

**Palavra-chave:** Fungos endofíticos, *Aspidosperma* sp., Atividade antimicrobiana, *Escherichia coli*.

**Apoio Financeiro:** Fundação Ezequiel Dias.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 072**

### **RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL**

DIAS, R.G.<sup>1</sup>; SILVA, T.M.L.<sup>1</sup>; BRITO, R.F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, Escola de veterinária, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: raisa-gdias@hotmail.com

A utilização dos agentes antimicrobianos se inicia em meados do século 20 com a descoberta da penicilina. Em medicina veterinária são aplicados em animais de produção de alimentos na forma de agentes terapêuticos, profiláticos e também como aditivos químicos que funcionam como promotores de crescimento, com objetivo de aumentar o desempenho dos animais e, consequentemente, a rentabilidade da atividade. No entanto, o uso de medicamentos em animais de produção pode favorecer a presença de resíduos em produtos alimentares, em especial quando utilizados de forma indiscriminada e ou quando o período de carência determinado para cada droga não é respeitado. O acúmulo destes resíduos resulta em prejuízos econômicos às indústrias, devido a falhas no processamento de produtos, e riscos à saúde do consumidor, por ocorrência de efeitos adversos como reações alérgicas e aparecimento de resistência bacteriana. Dessa forma, resíduos de antimicrobianos em alimentos torna-se um problema de saúde pública, devido à possibilidade de transferência de multirresistência entre os microrganismos e consequente surgimento de doenças não responsivas aos antimicrobianos ou outros tratamentos disponíveis. Com intuito de propiciar maior proteção ao consumidor, órgãos regulatórios mundiais como *Food and Drug Administration* (FDA) e *Codex Alimentarius*, estabeleceram valores de limite máximo de resíduo (LMR) para alguns medicamentos, estes valores possibilitaram que estes fármacos fossem monitorados nos produtos de origem animal de forma mais eficiente. No Brasil, esse monitoramento é regulamentado pelo Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC). Assim sendo, destaca-se a importância em investimentos na melhoria da fiscalização e desenvolvimento de alternativas de produção animal para reduzir a utilização excessiva e desnecessária dos antimicrobianos que podem afetar a segurança alimentar, com a presença excessiva de resíduos em alimentos.

**Palavras-chave:** Resistência a antimicrobianos, antibióticos, animais de produção de alimentos, LMR, segurança alimentar



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 073**

### **CARACTERIZAÇÃO E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Cryptococcus gattii* E *Cryptococcus neoformans***

Lima, C. M.; Sá, N. P.; Johann, S.

Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG.

*Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* são os principais agentes etiológicos causadores da criptococose, doença que pode afetar sítios pulmonares, cutâneos, ósseos e o sistema nervoso central, causando meningoencefalite. Atualmente, existem poucos antifúngicos disponíveis para o tratamento da criptococose, sendo os mais utilizados o fluconazol e a anfotericina B. Os mecanismos de resistência contra esses fármacos constituem um grande problema para o tratamento dessa doença. O presente estudo tem por objetivo caracterizar e avaliar o perfil de susceptibilidade a antifúngicos de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. Para isto, trinta isolados clínicos pertencentes à Coleção de Culturas do Laboratório de Micologia foram cultivados em meio ágar níger, a fim de observar a produção de melanina e no meio CGB para diferenciar as espécies de *C. gattii* e *C. neoformans*. Foi realizado ainda, uma PCR *fingerprint* utilizando o primer GTG5 a fim de realizar o agrupamento dos isolados. A susceptibilidade aos antifúngicos foi analisada através do teste de microdiluição em caldo seguindo as orientações do CLSI. As amostras foram cultivadas no meio ágar Sabouraud por 48 horas, e foram preparados inóculos fúngicos  $10^6$  células/mL em solução salina. Foram testados os fármacos antifúngicos fluconazol, itraconazol e anfotericina B. Com base nos dados obtidos foi possível observar que todas as amostras produziram melanina, e dois isolados clínicos foram identificados como *C. gattii* pelo cultivo no meio CGB. A partir da PCR *fingerprint* foi possível agrupar 23 isolados. Com relação ao ensaio de susceptibilidade, observou-se que os CIMs variaram de 2 a 16 mg/mL para fluconazol, de 0,125 a 1 mg/mL para itraconazol e de 0,5 a 2 mg/mL para anfotericina B. Além disso, 7 isolados foram resistentes ao itraconazol e 4 isolados foram resistentes a anfotericina B. Entretanto, mais estudos devem ser realizados para verificar a correlação entre a resistência *in vitro* e *in vivo* dessas amostras.

**Palavras-chave:** Criptococose, Caracterização, Antifúngicos



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 074**

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO HETEROCÍCLIO TIAZÓLICO RI76 EM  
MODELO MURINO DE CANDIDÍASE SISTÊMICA**

Lopes, L.F.F.<sup>1</sup>; Sá, N.P.<sup>1</sup>; Johann, S.<sup>1</sup>; Cruz, L.B.<sup>1</sup>; de Oliveira, R.B.<sup>2</sup>; Lino,C.I.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Leveduras, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG; <sup>2</sup>Laboratório de Química Farmacêutica, Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte, MG. E-mail: lafinamore@gmail.com

A Candidíase Sistêmica é uma infecção fúngica oportunista comum em indivíduos imunocomprometidos. É causada por microrganismos do gênero *Candida*, sendo mais comum a espécie *C. albicans*. Os sintomas são inespecíficos podendo iniciar com quadros de febre e progredir para cursos fulminantes como insuficiência renal. Para diagnóstico utiliza-se a cultura de sítios regularmente estéreis. O tratamento é feito principalmente com anfotericina B e fluconazol. Porém, devido aos efeitos colaterais e tóxicos ao organismo torna-se necessária a busca por novos antifúngicos seguros e efetivos para o tratamento da candidíase sistêmica. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antifúngica do heterocíclico tiazólico RI76 em modelo murino de candidíase sistêmica causada por *C. albicans*. Camundongos C57BL/6 fêmeas, com peso médio de 20g, foram infectados, através da veia lateral da calda, com suspensão de  $10^5$  células/animal de *C. albicans* SC5314 em 30 $\mu$ L de salina. Foram montados 3 grupos com 6 animais cada. O primeiro, com animais infectados, não recebeu nenhum tratamento, grupo controle. O segundo grupo, foi tratado com fluconazol (10mg/kg) via intraperitoneal. Por fim, o terceiro grupo recebeu tratamento com a substância de interesse RI76 (10mg/kg) também via intraperitoneal. O tratamento foi iniciado 3 horas após a infecção e persistiu de 12 em 12 horas por 5 dias. Após este período os animais foram eutanaziados e seus rins foram removidos para recuperação de UFCs. Para todos os camundongos dos 3 grupos não se observou mudança significativa de peso devido à infecção. Os resultados da recuperação de UFCs mostraram redução significativa da carga fúngica ( $p<0.05$ ) nos animais que receberam tratamento com fluconazol ou com RI76. Concluindo, notou-se que mesmo os animais não apresentando um quadro de imunossupressão a infecção foi estabelecida com sucesso. Este trabalho inicialmente reforça o potencial terapêutico da substância RI76 para tratamento da candidíase disseminada.

**Palavras chave:** Antifúngicos, *Candida albicans*, candidíase sistêmica, modelo murino.

**Apoio Financeiro:** FAPEMIG, CNPq.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 075**

### **AVALIAÇÃO *in vitro* E *in vivo* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS CONTRA LINHAGENS DE *Trichophyton interdigitale***

Carmo, P. H. F.<sup>1</sup>; Bastos, R. W.<sup>1</sup>; Carneiro, H. C. S.<sup>1</sup>; Costa, M. C.<sup>1</sup>; Baltazar, L. M.<sup>2</sup>; Santos, D. A.<sup>1</sup>; Resende-Stoianoff, M. A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Micologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil; <sup>2</sup>Laboratório de Interações Microrganismo-Hospedeiro, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: paulofonsecca@gmail.com

As dermatofitoses incluem algumas das doenças mais comuns dos seres humanos. Apesar de haver no mercado substâncias para o tratamento destas infecções, grande parte dos compostos apresenta elevada toxicidade para os pacientes, o que torna fundamental a busca por novos antifúngicos. Por constituir uma fonte de produtos biologicamente ativos, o uso de plantas tem sido cada vez mais uma alternativa para a prospecção por novos medicamentos. O potencial antifúngico de três óleos essenciais (OE1, OE2, OE3) foi testado por meio da concentração inibitória mínima (CIM) contra linhagens de *T. interdigitale*, em monoterapia e em terapia combinada com itraconazol. Além disso, o potencial desses extratos foi testado quanto à capacidade de modular a atividade fungicida de macrófagos derivados de medula óssea por meio da quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, taxa de fagocitose e análise do perfil de proliferação intracelular. A atividade citotóxica destes compostos na viabilidade do macrófago também foi testada em diferentes concentrações. Os OE1 e OE2 ainda foram testados quanto a capacidade de diminuir a carga fúngica em modelo murino de dermatofitose. A faixa de CIM para os compostos testados foi de 0,06-0,01% (%v/v) para OE1, de 0,5-0,03% (%v/v) para OE2 e de 1-0,12% (%v/v) para OE3, valores baixos quando comparados ao itraconazol (0,5-0,12µg/mL). Em combinação com o itraconazol, os óleos essenciais apresentaram atividade majoritariamente indiferente e, em alguns casos, sinergismo dependente da concentração. Observou-se que os compostos testados induzem a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, bem como aumentam a atividade fagocítica. O perfil de proliferação intracelular, entretanto, não demonstrou dependência com a ação dos óleos essenciais. *In vivo*, observou-se que o tratamento com OE1 e OE2 têm a capacidade de reduzir a carga fúngica nos animais infectados, indicando um potencial promissor do uso dos óleos essenciais.

**Palavras-chave:** Dermatofitose. Óleo essencial. Atividade antifúngica. *Trichophyton interdigitale*.

**Apoio Financeiro:** CNPq, FAPEMIG, CAPES.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 076**

### **DETECÇÃO DO DNA DO FUNGO *Sporothrix sp.* UTILIZANDO A REAÇÃO DE PCR EM LAMINAS DE ESFREGAÇÕES DE LESÕES DE GATOS**

La-Santrer, E.F.R.<sup>1</sup>; Assunção, C.B. <sup>1</sup>; Fernandes, J. B. <sup>1</sup>; Carvalho, R. J. <sup>1</sup>; Caligorne, R. B. <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: [rachelbc@santacasabh.org.br](mailto:rachelbc@santacasabh.org.br)

A esporotricose é uma doença causada pelo fungo *Sporothrix sp.*, um fungo dimórfico com ampla disseminação e predominante em áreas tropicais e subtropicais. O meio mais comum de contaminação é mediante a inoculação do fungo por possíveis traumatismos em troncos, espinhos ou por lesões causadas por arranhões e/ou mordidas de gatos infectados. A principal forma de prevenir a infecção em seres humanos é realizar o diagnóstico precoce em felinos contaminados e iniciar o tratamento com antimicóticos. O método utilizado para o diagnóstico diferencial em felinos é o imprint da lâmina sobre a lesão utilizando corante rápido para Hematologia (INSTANT-PROV). Diante disto, o presente trabalho objetivou analisar a detecção do DNA do *Sporothrix sp.* por meio da reação em cadeia da polimerase – PCR, a partir de amostras obtidas de exames citopatológicos, a fim de confirmar o diagnóstico da esporotricose. As lâminas foram raspadas e o material obtido foi ressuspensido em água estéril, aquecido e centrifugado. Para a PCR foram utilizados os iniciadores ITS1 e ITS4. Em um teste piloto, foi possível detectar o DNA fúngico em 66% das lâminas analisadas. Mediante a importância do diagnóstico precoce da esporotricose a técnica da PCR pode ser uma possível metodologia já que pode detectar o genoma do fungo em pequenas concentrações.

**Palavras chave:** Sporothrix, PCR, dimórfico, Esporotricose.

**Apoio financeiro:** FAPEMIG, CNPq.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 077**

**ÓLEO DE MELALEUCA E PRÓPOLIS COMO INBIDORES FARMACOLÓGICOS NATURAIS DE *CANDIDA ALBICANS* – TRATAMENTOS ALTERNATIVOS PARA CANDIDIASE**

Casteluber, M.C.F, Oliveira, S.C., Figueiredo, G.C

Laboratório de microbiologia aplicada do departamento de Ciências Biológicas da universidade do Estado de Minas Gerais, UEMG, Ibirité, MG.

Desde os primórdios da humanidade os medicamentos naturais vêm sendo utilizados para o tratamento de doenças humanas. A *Candida albicans* é um fungo oportunista capaz de infectar várias partes do organismo humano e de animais. O tratamento para esta infecção, com os medicamentos atualmente disponíveis, é longo e muitas vezes ineficaz pela falta de adesão do paciente ou até mesmo por resistência do fungo aos antimicóticos disponíveis. O objetivo deste estudo foi analisar “in vitro” a eficácia do Extrato de Própolis e do óleo de Melaleuca como fármaco natural para tratamento alternativo contra candidíase. Além disso, comparar a eficácia desses extratos com o antifúngico de escolha para o tratamento, o fluconazol. Primeiramente o extrato de própolis puro foi diluído 10 x em água destilada, o que foi padronizado previamente. Já o óleo de melaleuca foi obtido em farmácia de manipulação e utilizado na concentração de 10%. O método utilizado foi de difusão em ágar utilizando discos de papel filtro de 6mm, sendo que todos os testes foram realizados em triplicata de forma asséptica em capela de fluxo laminar. Nos testes realizados o óleo de melaleuca se mostrou eficiente na inibição do fungo, com eficácia comparada ao fluconazol (controle positivo +), o extrato de própolis apresentou halos de inibição do crescimento do fungo, mas foi inferior ao observado com o óleo de melaleuca e fluconazol. A concentração inibitória mínima (MIC) foi feita pelo método de macrodiluição seriada.

**Palavras – chave:** óleo de melaleuca, própolis, *candida albicans*.

**Apoio financeiro:** PaPq



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 078**

### **ANÁLISE DE COINFECÇÃO POR DENGUE VIRUS E ZIKA VIRUS EM CÉLULAS ANIMAIS E EM CÉLULAS DE MOSQUITO C6/36.**

Capila, R.F.<sup>1,2</sup>; Mendonça D.C. <sup>1,2</sup>; Oliveira, L.C. <sup>1,2</sup>; Abrahão, J. S. <sup>2</sup>; Drumond, B. P. <sup>2</sup>; Trindade, G. S <sup>2</sup>; Kroon, E. G. <sup>2</sup>; Bonjardim,C. A <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Transdução de Sinal;

<sup>2</sup> Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

*Dengue virus* (DENV) e *Zika virus* (ZIKV) são arbovírus pertencente ao gênero *Flavivirus* e causadores de doenças de curso agudo, que podem apresentar complicações graves e que apresentam manifestações clínicas que podem ser facilmente confundidas. *Dengue virus* apresenta alta incidência e hoje é prevalente em mais de 100 países, com mais de 2.5 bilhões de pessoas em risco nos países endêmicos e pode ser causada por qualquer um dos 4 sorotipos distintos (DENV 1-4); o *Zika vírus* causou, entre 2015-16, epidemias nas Américas, Pacífico, África e sudeste asiático e foi declarado problema de saúde pública global pela OMS diante da associação da doença com casos de má formação congênita, em particular a microcefalia e outras desordens neurológicas, serem reportados no Brasil. A co-circulação dos sorotipos de Dengue e do *Zika vírus*, bem como de outros arbovírus pode ocorrer em todo o território brasileiro, favorecida fortemente pelo fato destes vírus infectarem o mesmo mosquito vetor, *Aedes aegypti*, o qual possui ampla distribuição em zona urbana. Alguns casos de coinfecção por ambos os vírus em humanos já foram reportados no Brasil, em países da América e no Pacífico. O objetivo deste projeto, portanto, é investigar infecções isoladas e coinfeção *in vitro* por ZIKV e DENV em linhagens de célula de mamífero e em células de inseto (*A. albopictus*), uma vez que os poucos estudos de coinfeção por diferentes *Flavivirus* se limitam a células de inseto e não há estudos de coinfeção entre ZIKV e DENV. Para isso foi padronizado um sistema de quantificação absoluta de cópias genômicas (equivalentes genômicos), por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), de ZIKV e DENV-4, que será usado em estudos subsequentes de infecção por estes *Flavivirus* nas diferentes células e em diferentes multiplicidades de infecção. A validação deste sistema de quantificação permitirá avaliar o impacto da coinfeção na replicação dos dois vírus, e posteriormente servir como modelo para análise de antivirais.

**Palavras Chave:** *Dengue virus; Zika virus; coinfeção*

**Instituições Financiadoras:** CNPq, CAPES e FAPEMIG



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 079**

### **“POTENTIAL ANTIVIRAL USE OF Src/Abl AND MEK/ERK INHIBITORS AFTER ENCEFALITE’S SAINT LOUIS VIRUS INFECTION”**

Colquehuanca, N.E.A.<sup>1</sup>, Aguiar, M.C.A.M.<sup>1</sup>, Reis, E.V.S.<sup>1</sup>; Abrahão, J.S.<sup>1</sup>, Ferreira, P.C.P.<sup>1</sup>, Kroon, E.G.<sup>1</sup>, Bonjardim, C.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

E-mail: [nidiestherarias@gmail.com](mailto:nidiestherarias@gmail.com)

Several viruses of great importance in public health are included in the *Flavivirus* genus, such as *Dengue virus* (DENV), *Saint Louis Encephalitis virus* (SLEV) and *Zika virus* (ZIKV). SLEV is widely distributed in the Americas and can cause from febrile syndromes to fatal meningoencephalitis. Similarly to other viruses, there is still no effective treatment against SLEV. A new approach to treatment lies in the search for cellular proteins as therapeutic targets, since the viruses as obligatory intracellular parasites, use various components of the cellular machinery for their replication. Previous studies demonstrated that pharmacological inhibitors (PI) of cellular protein kinases (PK) exhibit a potential antiviral activity against different Flaviviruses, including PI of members of Src/Abl (W and Z) and MEK/ERK (X, Y and V) PK families. For that reason, the current work intends to investigate the potential antiviral effect resulting from the association of these PI, which can act at different steps of the SLEV multiplication cycle and its effect on virus multiplication *in vitro*. For this purpose, different combinations between PI were tested, aiming for the minimum concentrations (MC) capable of promoting the reduction of at least one logarithmic unit in the viral titer. A Western blot assay was performed, where the MC able to inhibit the phosphorylation of the respective PK were determined and, subsequently, the MC to be tested were chosen. Next, dose-response assays were performed to determine the combinations that showed a possible antiviral effect. No significant reduction in viral titer was observed in all combinations tested between the MEK/ERK (Y) and Src/Abl (Z) PI. However, by replacing the MEK/ERK (Y) with (V), the reduction was more expressive when compared to the individual antiviral action of both PI. Drug association studies are widely used and aim to minimize side effects, by decreasing doses used and, consequently, reducing a potential drug resistance.

**Keywords:** *Saint Louis Encephalitis virus*, Src, MEK/ERK, Virus-host interaction, Antiviral.

**Apoio Finaceiro:** CNPq, CAPES e FAPEMIG



## **RESUMOS**

**Número: 080**

### **DETECTION, MOLECULAR CHARACTERIZATION AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF EQUINE INFECTIOUS ANEMIA VIRUS OF NATURALLY INFECTED HORSES FROM THE BRAZILIAN PANTANAL**

Cursino, A.E.<sup>1</sup>; Luiz, A. P. M. F.<sup>1,2</sup>; Vilela, A.P.P.<sup>3</sup>; de Aguiar, D.M.<sup>4</sup>; Tavares de Lima, M.F.N<sup>5</sup>; Araújo Jr, J. P.<sup>6</sup>; Drumond, B. P.<sup>1</sup>; Kroon, E.G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte /MG; <sup>2</sup>Viriontech do Brasil Indústria de Insumos e Serviços em Biotecnologia, Belo Horizonte/MG; <sup>3</sup>Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia, Hospital Universitário, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC; <sup>4</sup>Laboratório de Virologia e Rickettsioses do Hospital Veterinário, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá/MT; <sup>5</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Corumbá/MS; <sup>6</sup>Laboratório de Diagnóstico Molecular, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu/São Paulo. E-mail: [andreiacursino@yahoo.com.br](mailto:andreiacursino@yahoo.com.br)

The equine infectious anemia (EIA) is caused by *Equine infectious anemia virus* (EIAV), a Retrovirus, which infects equids, being one of the 11 equine diseases of compulsory notification by World Organisation for Animal Health (OIE). EIA presents a worldwide distribution, and is also widespread in Brazilian territory. In Pantanal the impact is high on horse's performance and indirectly on the livestock activity of this region, since the horses are used for cattle management. In the present study we developed a semi-nested PCR (sn-PCR) in the 5' LTR to tat gene region and a PCR in the region of tat to gag gene, for the detection of proviral DNA of EIAV which amplify a fragment of 185 bp and 311 bp, respectively. We tested 59 peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) samples of naturally infected horses from Corumbá city, Mato Grosso do Sul, Brazil. The PCR products were submitted to electrophoresis on a polyacrylamide gel, and DNA was purified, sequenced and a phylogenetic analysis was made. Serological tests AGID, ELISA for p26 and gp90 protein were performed for these same samples. The sn-PCR for LTR allowed the amplification of proviral DNA from 30 samples, and sn-PCR for gag amplified 18 samples. The 23 nucleotide sequences obtained for LTR presented until 91% nucleotide identity with EIAV reference sequences available in GenBank. The 18 nucleotide sequences obtained for gag presented until 87% nucleotide identity with EIAV reference sequences. The two phylogenetic trees showed that Brazilian sequences form a separate clade as compared the other world sequences, supported by a high value bootstrap. This work provides tools for molecular characterization of the viruses, besides the Brazilian Pantanal sequences contributes to the knowledge of the circulating EIAV in Brazilian territory. It contributes significantly with new informations about EIAV genetic diversity and provides also data for epidemiological studies of EIA incidence in Pantanal and Brazil.

**Financial support:** CNPq, CAPES, PRPq-UFMG, FAPEMIG, Embrapa



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 081**

### **VACCINIA VIRUS GROUP CO-INFECTION IN A DAIRY WORKER WITH OCULAR VACCINIA INFECTION**

Maurício Teixeira Lima<sup>1</sup>; Grazielle Pereira Oliveira<sup>1</sup>; Danilo Bretas de Oliveira<sup>1,3</sup>; Sidiner Mesquita Vaz<sup>2</sup>; Giliane de Souza Trindade<sup>1</sup>; Jônatas Santos Abrahão<sup>1</sup>; Erna Geessien Kroon<sup>1</sup>.

Authors affiliation: <sup>1</sup>Departamento de Microbiologia , Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, CEP 30270-901, Brazil; <sup>2</sup>Casa de Caridade de Carangola, Minas Gerais, CEP 36800-000, Brazil; <sup>3</sup>Faculdade de Medicina de Diamantina, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, CEP 39100-000, Brazil

The *Vaccinia virus* (VACV), the prototype virus of the genus *Orthopoxvirus* (OPV), shows serological cross-reactivity with other OPV species and was used during the smallpox eradication campaign. Several exanthematic VACV outbreaks have occurred in Brazil, affecting mainly the dairy cattle and rural workers. Previous studies demonstrated that circulating viruses belonged to at least two distinct genetic clusters. In September 2015, an unvaccinated, 45-year-old man that worked on a farm located in Carangola County, Minas Gerais State, Brazil, developed manifestations of VACV infection, including fever and painful vesiculo-pustular lesions. He had lesions on the left hand, right arm, and nose, as well as an atypical manifestation in the left eye with aches in the ocular globe and periorbital region. The clinical condition progressed to significant visual acuity losses in the affected eye. Dried swab specimens from his lesions were used for molecular diagnosis using OPV-specific PCR that targeted the *C11R* gene and the *A56R* gene. All samples were positive for both OPV targets. Vero cells were infected with the specimen supernatants to isolate the virus. The VACV was isolated from the hand, nose and eye samples from the patient. These isolates were tested for their plaque phenotypes in BSC-40 cells, which demonstrated the presence of at least two types of viral populations composed by small and large plaques. The viral clones were propagated and their DNA was isolated. The molecular markers genes *A56R*, *B5R*, *C23L* and *A26L* confirmed the molecular dichotomy of the isolated viruses. In summary, our study demonstrated the genetic and phenotypic variability between two viruses isolated from the same sample in a natural human co-infection with VACV. The viruses belong to two distinct Brazilian VACV groups, expanding previous works with other hosts. This study is the first to prove the association and isolate VACV samples from a natural ocular vaccinia infection case.

**Keywords:** *Vaccinia virus* ; ocular infection; ocular vaccinia

**Financial support:** CNPq, CAPES, PRPq-UFMG, FAPEMIG, MAPA



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 082**

**CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS ZOONÓTICOS DE VACCINIA VIRUS GUARANI P1 (GP1V) E PASSATEMPO (PSTV) E AVALIAÇÃO DE SUA CAPACIDADE EM MODULAR VIAS DE RESPOSTA DO HOSPEDEIRO À INFECÇÃO, IN VIVO E IN VITRO**

Lourenço, K. L., Leão, T. L., Fonseca, F.G.

Laboratório de Virologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG.  
Email: karine\_lourenco@hotmail.com

*Vaccinia vírus* (VACV) é membro da família *Poxviridae* e gênero *Orthopoxvirus*. O sucesso replicativo do *Poxvirus* depende da sua capacidade de bloquear, evadir ou subverter elementos essenciais da resposta imune. No entanto, a resposta imune a novos isolados é mal compreendida. Este projeto visa investigar perfis de imunomodulação e virulência de isolados brasileiros de VACV, *Guarani P1 vírus* (GP1V) e *Passatempo vírus* (PSTV), *in vitro* e *in vivo*, em comparação com o *Western Reserve* (WR). Células BSC-40 foram infectadas com diferentes MOI para obtenção das curvas de ciclo único e múltiplos ciclos. Ensaios de fenótipo de placa também foram realizados. Camundongos Balb/C foram inoculados com  $10^6$  PFU dos isolados e foram avaliados quanto a perda de peso e sinais clínicos. Após 7 d.p.I, eles foram eutanasiados e tiveram seus órgãos coletados para quantificação viral por qPCR. Células MEFs também foram infectadas para avaliar o processamento do mRNA do fator de transcrição XBP1 (FT) por RFLP; este FT é essencial para diversas vias de resposta do hospedeiro à infecção. As curvas de ciclo único e múltiplos ciclos, mostraram um perfil similar entre GP1V e WR; PSTV, entretanto, apresenta menor produtividade viral. GP1V produziu placas de lise de tamanho semelhante ao WR; PSTV apresentou placas menores. A avaliação de XBP1, demonstrou que nenhum dos três isolados ativam essa via. A análise dos sintomas clínicos revelou que: os animais infectados com GP1V e WR apresentam sintomas típicos de infecção por VACV, ao passo que os infectados com PSTV apresentam sintomas moderados. A qPCR indicou maior quantidade de DNA viral no pulmão dos animais infectados com PSTV em relação ao grupo GP1V. Não foi encontrado DNA viral do PSTV, no baço e cérebro desses animais, no entanto, os grupos infectados com GP1V e WR, apresentam grandes quantidades de DNA viral nesses órgãos. Em síntese, GP1V apresenta um perfil de virulência semelhante ao WR, enquanto o PSTV exibe um perfil mais moderado.

**Palavras-chave:** VACCINIA VIRUS, GP1V, PSTV, WR, caracterização biológica.

**Apoio Financeiro:** CAPES, FAPEMIG, CNPq.



## **RESUMOS**

**Número: 083**

### **IMPLEMENTAÇÃO DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE INFECÇÃO PELO *Chikungunya virus***

**Moreira, T. P.<sup>1</sup>; Sousa, C. D. F.<sup>1</sup>; Bambirra, J. L.<sup>1</sup>; Passos, I. B. S.<sup>2</sup>; Queiroz-junior, C. M.<sup>3</sup>; Camargos, V. N.<sup>1</sup>; Teixeira, M. M.<sup>2</sup>; Costa, V. V. <sup>1;2;3</sup>; Souza, D. G<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Laboratório de Interação Microrganismo-Hospedeiro, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. <sup>2</sup>Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. <sup>3</sup>Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. Email: [thaianepmoreira@gmail.com](mailto:thaianepmoreira@gmail.com)

A febre Chikungunya é uma doença viral causada pelo *Chikungunya virus* (CHIKV), um arbovírus da família Togaviridae, pertencente ao gênero *Alphavirus*. O principal fator patognomônico dessa infecção é a artrite inflamatória que leva à poliartralgia inflamatória crônica. Embora existam vários estudos, a interação vírus-hospedeiro ainda não está clara. Assim, nosso objetivo foi implementar um modelo experimental de infecção por CHIKV em camundongos imunocompetentes. Para tanto, animais de quatro semanas de idade da linhagem C57/BL6 foram infectados por via intraplantar com  $1 \times 10^6$  PFU de CHIKV. Os parâmetros clínicos e inflamatórios, como edema de pata, peso corporal, hipernocicepção, análise histopatológica, recrutamento de leucócitos (atividade de mieloperoxidase - MPO) e produção de mediadores inflamatórios foram analisados em diferentes dias da infecção (1, 3, 7 e 14 dias para todos os parâmetros, exceto para edema e hipernocicepção que foram analisados até o 28º dia). A carga viral foi avaliada em diferentes órgãos por meio de ensaio de titulação de placa. Nossos resultados mostraram que a inoculação intraplantar de CHIKV induziu hiperinocicepção que perdurou até o 21º dia da infecção, retornando aos níveis basais no 28º dia. Além disso, a infecção não foi associada a nenhuma alteração no peso corporal e no volume da pata. O vírus foi recuperado do linfonodo poplíteo no 1º dia e do baço do 1º ao 3º dia da infecção. Ainda, observamos, através da análise histopatológica da pata, uma intensa inflamação com perda da arquitetura tecidual no 7º dia da infecção. Corroborando esses resultados, níveis aumentados dos mediadores CCL5, MCP-1 e IL-6 foram encontrados na pata no 1º dia da infecção. Finalmente, a atividade de MPO na pata foi aumentada a partir do 1º dia, atingindo o pico no 7º dia da infecção. Assim, descrevemos um modelo de infecção por CHIKV, o qual poderá ser utilizado para outros estudos que visam investigar a patogênese do vírus e testes terapêuticos.

**Palavras-chave:** Febre Chikungunya, *Chikungunya virus*, hipernocicepção, inflamação  
**Apoio financeiro:** INCT Dengue, CAPES, CNPq, FAPEMIG



## **RESUMOS**

**Número: 084**

### **CO-INFECÇÕES ENTRE O VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA E OUTROS PATÓGENOS EM AVICULTURA FAMILIAR**

Costa, C. S.<sup>1</sup>; Coelho, H. L.G.<sup>1</sup>; Pinto, P. N.<sup>2</sup>; Mureb, E. N.<sup>2</sup>; Medeiros, L. B.<sup>2</sup>; Torres, A. C. D.<sup>3</sup>; Bretz, B. A. M.<sup>3</sup>; Buiatte, A. B. G.<sup>4</sup>; Marín-Gómez, S. Y.<sup>5</sup>; Martins, N. R. S.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Graduanda em Medicina Veterinária da Escola de Veterinária da UFMG; <sup>2</sup>Programa de Residência Integrada em Medicina Veterinária da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais; <sup>3</sup> Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais; <sup>4</sup> Programa de Residência Uniprofissional em Medicina Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia; <sup>5</sup>Prof. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG. E-mail: [camilasiqueiracosta@gmail.com](mailto:camilasiqueiracosta@gmail.com)

As doenças imunodepressoras estão frequentemente associadas às infecções secundárias por vírus, bactérias, fungos e parasitas, aumentando显著mente os custos de produção por baixo desempenho, tratamentos, falhas nas vacinação e condenação ao abate. As galinhas (*Gallus gallus domesticus*) são consideradas o único hospedeiro natural conhecido do vírus da anemia infecciosa (CAV). A doença é caracterizada por anemia, atrofia dos órgãos linfóides, desuniformidade, imunodepressão e baixos índices produtivos, especialmente graves em aves jovens de até 3 semanas de idade. Objetivou-se investigar a ocorrência de CAV em aves de subsistência em Minas Gerais, e a investigação de co-infecção por patógenos oportunistas ou primários. Realizou-se a necropsia completa de 74 aves com idade entre 30 dias e 20 semanas, de diferentes origens no Estado, com histórico clínico de baixo desempenho, inatividade e prostração. A mucosa de segmentos intestinais foi avaliada em microscopia, para o diagnóstico de parasitoses microscópicas, e os órgãos linfóides (timo, baço e bolsa cloacal) e traquéia foram coletados para o diagnóstico molecular. O DNA e RNA total das amostras foi extraído pelos método de sílica e TRIzol®, respectivamente, e a seguir, realizada a PCR para CAV e *Mycoplasma gallisepticum*, e RT-PCR para doença infecciosa bursal. Ao exame coproparasitológico, pesquisou-se em microscopia helmintoses e protozooses (*Eimeria* spp). Das 74 amostras, 26 aves (35%) foram positivas para CAV. Nestas, observou-se a co-infecção com IBDV (vírus da doença infecciosa bursal) em 3,8% das amostras, *M. gallisepticum* 38,5% das amostras, eimerioses 26,9% e helmintoses 23% (*Ascaridia galli*, *Capillaria* spp, *Heterakis gallinarum*, *Histomonas meleagrididis*, *Raillietina* spp). Os achados confirmam a ocorrência de co-infecções, possivelmente potencializadas pelo efeito imunodepressor de CAV e associadas às condições sanitárias de intercâmbio e transmissão de patógenos comuns ao tipo de criação.

**Palavras chave:** Vírus da anemia infecciosa das galinhas, *Mycoplasma gallisepticum*, *Eimeria*, helmintoses.

**Apoio Financeiro:** CAPES, CNPq, FAPEMIG.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 085**

**DETECÇÃO DE *Vaccinia virus* EM QUEIJO ARTESANAL COMERCIALIZADO NO BRASIL.**

Jaqueleine Silva de Oliveira<sup>1</sup>, Galileu Barbosa Costa<sup>1</sup>, Poliana de Oliveira Figueiredo<sup>1</sup>, Ana Gabriella Stoffella Dutra<sup>1</sup>, Carolina Dourado Amaral<sup>1</sup>, Ana Teresa Saraiva Silva<sup>1</sup>, Betânia Paiva Drumond<sup>1</sup>, Jônatas Santos Abrahão<sup>1</sup>, Erna Geessien Kroon<sup>1</sup>, Giliane de Souza Trindade<sup>1</sup>.

1 – Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Os surtos de vacínia bovina (VB) na América do Sul, causados pelo *Vaccinia virus* (VACV) acometem principalmente o gado leiteiro e os ordenadores. A forma clássica de transmissão do VACV consiste no contato direto entre o ordenhador e o bovino infectado. Além disso, VACV tem sido detectado em amostras de leite e as partículas virais permanecem viáveis mesmo quando submetidas a diferentes tratamentos términos e durante o preparo de queijo artesanal. O papel do queijo e derivados no ciclo epidemiológico do VACV ainda permanece incógnito. Portanto, investigamos se o queijo artesanal comercial poderia ser uma fonte de VACV, e consequentemente rota de exposição alternativa ao vírus. Trinta e oito amostras de queijo artesanal comercial foram coletadas durante Junho 2015 – Maio 2017, em Belo Horizonte, capital do estado de Minas Gerais. No entanto, seus locais de origem correspondem às principais bacias leiteiras do estado. Para detecção de DNA do VACV, foram realizadas nested-PCR OPV-específica tendo como alvo o gene C11R e PCR em tempo real para amplificar um fragmento do gene A56R. Oito amostras (21%) foram positivas para C11R e três (7,9%) positivas para A56R. Apenas uma amostra (2,6%) foi positiva para ambos os genes. A presença do VACV foi confirmada por sequenciamento. O consumo de produtos lácteos já foi apontado como possível rota de transmissão do VACV. No entanto, a dinâmica da infecção através dessa rota alternativa ainda é desconhecida. A presença do VACV em queijo artesanal pode favorecer a exposição de humanos ao vírus e impactar a economia leiteira, uma vez que os queijos artesanais produzidos em Minas Gerais são reconhecidos como Patrimônio Imaterial do Estado. Estudos adicionais são necessários para esclarecer o papel do queijo artesanal como uma via alternativa de transmissão de VACV. Além disso, os produtores de queijos pertencentes às bacias de produtos lácteos afetados devem ser educados quanto à circulação de VACV e seus riscos.

**Apoio Financeiro:** CAPES, CNPq e FAPEMIG.

**Palavras-chave:** *Vaccinia virus*, queijo artesanal, rotas alternativas de transmissão, epidemiologia.



## **RESUMOS**

**Número: 086**

### **VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA DAS GALINHAS EM OUTRAS ESPÉCIES DE AVES**

Pinto, P. N.<sup>1</sup>; Mureb, E. N.<sup>1</sup>; Medeiros, L. B.<sup>1</sup>; Silva, A. S. G.<sup>2</sup>; Torres, A. C. D.<sup>2</sup>; Coelho, H. L.G. <sup>3</sup>; Costa, C. S.<sup>3</sup>; Buiatte, A. B. G.<sup>4</sup>; Marín-Gómez, S. Y.<sup>5</sup>; Martins, N. R. S.<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Programa de Residência Integrada em Medicina Veterinária da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais; <sup>2</sup> Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais <sup>3</sup> Graduanda em Medicina Veterinária da Escola de Veterinária da UFMG; <sup>4</sup> Programa de Residência Uniprofissional em Medicina Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia; <sup>5</sup> Prof. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG. E-mail: priscilanatalia24@gmail.com

O vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV) participa da patogenia de muitas doenças em galinhas. A imunossupressão de linfócitos T ocorre principalmente em aves (*Gallus gallus domesticus*) jovens de até 3 semanas de idade, e a imunodepressão ocorre em aves mais velhas. Nas aves jovens causa grave anemia, atrofia generalizada de órgãos linfoides, retardamento no crescimento, infecções oportunistas e mortalidade variável. A doença resulta em aumento nos custos de produção, com redução na produtividade e crescimento, necessidade de tratamento contra infecções oportunistas, falhas na proteção vacinal e condenação no abatedouro. A galinha é o único hospedeiro natural conhecido do vírus e muitos aspectos da sua epidemiologia não estão totalmente esclarecidos. A ocorrência integrantes de *Circoviridae* está caracterizada em diversos hospedeiros, como humanos, suinos, canários, psitacídeos, etc. Entretanto, o *Gyrovirus* CAV não foi investigado em outras espécies de aves domésticas e silvestres. Objetivou-se pesquisar a presença do genoma de CAV em espécies de aves domésticas e silvestres, incluindo nove (9) plantéis diferentes de codornas, oito (8) plantéis de patos, quatro (4) plantéis de avestruzes, quatorze (14) origens diferentes de pombos e cinquenta e oito (58) espécies de aves silvestres das ordens *Anseriformes*, *Columbiformes*, *Falconiformes*, *Galliformes*, *Passeriformes*, *Psittaciformes*, *Rheiformes* e *Strigiformes*, encaminhadas para diagnóstico no Laboratório de Doença das Aves da Escola de Veterinária da UFMG. Foram realizadas necropsias completas das aves e coletados timo, baço, fígado e bolsa cloacal para análise molecular. O DNA total foi extraído dos tecidos com iodeto de sódio e adsorção à sílica. Para a detecção de CAV nos tecidos foram utilizadas PCR e nested-PCR. Não foi amplificado o genoma de CAV em nenhuma das espécies testadas. Os resultados indicam que CAV é vírus específico de galinhas não ocorrendo nas espécies de aves silvestres e domésticas testadas.

**Palavras chave:** vírus da anemia infecciosa das galinhas, silvestre, ave doméstica.

**Apoio Financeiro:** CAPES, CNPq, FAPEMIG.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 087**

### **FOLLOWING UP INFECTED YELLOW FEVER VIRUS PATIENTS: A PROSPECTIVE STUDY AND NEW DISCOVERIES ABOUT THIS VIRUS AND THE DISEASE, DURING AN OUTBREAK IN MINAS GERAIS, IN 2017**

Izabela Maurício de Rezende<sup>1</sup>, Livia Sacchetto Pengo<sup>1</sup>, Tayrine Araujo<sup>2</sup>, Dario Brock Ramalho<sup>2</sup>, Maria Rita Dutra<sup>2</sup>, Leonardo Soares Pereira<sup>2</sup>, Felipe Iani<sup>3</sup>, Pedro Augusto Alves<sup>4</sup>, Matheus Soares Arruda<sup>1</sup>, G.L. Milanez<sup>2</sup>, T. Drummond<sup>2</sup>, T.E.R. Adelino<sup>3</sup>, Glauco Carvalho<sup>3</sup>, M. Oliveira<sup>3</sup>, Marcelo Pascoal<sup>4</sup>, Carlos Eduardo Calvazarra<sup>4</sup>, Jaqueline Germano de Oliveira<sup>4</sup>, Giliane de Souza Trindade<sup>1</sup>, Erna Geessien Kroon<sup>1</sup>, Betania Paiva Drumond<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Vírus – ICB – Universidade Federal de Minas Gerais – Belo Horizonte – MG

<sup>2</sup> Hospital Eduardo de Menezes – Belo Horizonte- MG

<sup>3</sup> Laboratório de Biologia Molecular – Fundação Ezequiel Dias – Belo Horizonte – MG

<sup>4</sup> Instituto René Rachou – Fiocruz Minas – Belo Horizonte – MG

Email: izabelamauriciorezende@gmail.com; betaniadrumond@gmail.com

The most severe Yellow Fever epidemic recorded in Brazil in recent decades was reported in 2017 with 475 confirmed cases and 162 confirmed deaths in Minas Gerais (MG) state. The aim of this study was to do a prospective study of yellow fever virus in 96 patients admitted to the Eduardo de Menezes Hospital (HEM)-MG, with suspicion of YFV infection. Sera were collected and used in routine YFV and DENV IgM tests, RT-qPCR, and in viral isolation. Twenty-three patients were YFV negative, four of them had arbovirus infection. A total of 73 patients had the diagnosis of YF based only on PCR (38), on viral isolation (03), serology (42) or serology and PCR (22). Among the YFV positive patients, 12 received YFV vaccine before the recent infection. Two of these patients died, and both took YFV vaccine 15 days before onset of the symptoms. Nineteen patients evolved to death, mainly alcoholics, men, 30-60 years old, who lived in rural area. The 54 patients who recovered were followed up for at least four months after the medical release. Interestingly, after approximately 60 days after medical release, 11 patients reported asthenia and tiredness, and the values of hepatic enzymes AST and ALT that were previously decreasing, presented an increase. During this time, we tested urine and serum from these patients, using YFV RT-qPCR, and all were negative. All these patient's samples were tested by PCR for DENV, ZIKV, CHIKV, and other viruses that can cause hepatitis, and all were negative. One patient (male, 51 years old and farmer) had a liver biopsy collected 60 days after the medical release, and it was tested positive in PCR. Liver enzyme values were also altered in this patient (AST 987U/L; ALT 1285U/L). As far as we know this condition has never been described after acute yellow fever and demonstrate the importance of the follow up of the patients after medical release. Further studies are needed for better understanding of the disease course including the convalescence period.

**Key Words:** arbovirus, flavivirus, yellow fever virus, zoonoses, reemerging virus

**Financial support:** FAPEMIG, CNPq, CAPES



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 088**

### **ANÁLISE RETROSPECTIVA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À FEBRE AMARELA NO ESTADO DE MINAS GERAIS ENTRE 2001 E 2014**

STOFFELLA-DUTRA, A.G.<sup>1</sup>; COSTA, G.B.<sup>1</sup>; OLIVEIRA, J.S.<sup>1</sup>; FIQUEIREDO, P.O.<sup>1</sup>; AMARAL, C.D.<sup>1</sup>; SARAIVA-SILVA, A.T.<sup>1</sup>; BONJARDIM, C.A.<sup>1</sup>; ABRAHÃO, J.S. <sup>1</sup>; DRUMOND, B.P.<sup>1</sup>; KROON, E.G.<sup>1</sup>; TRINDADE, G.S.<sup>1</sup>

1— Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

A Febre Amarela (FA) é uma doença viral aguda, causada pelo *Yellow Fever virus* (YFV), protótipo da família *Flaviviridae*. O YFV infecta humanos e primatas não-humanos podendo ocasionar epidemias graves, evoluindo para doença hemorrágica fatal. A FA possui grande impacto na saúde pública nas regiões em que é endêmica, inclusive no Brasil, mesmo com a disponibilidade de uma vacina. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência de casos de FA em Minas Gerais entre 2001 e 2014, e os possíveis fatores de risco. Foi conduzido um estudo retrospectivo na base de dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação, com os dados referentes ao período de 2001 a 2014. Um total de 86 casos foram registrados nesse período, sendo a maioria em 2003. A maioria dos casos (n=76) foram do sexo masculino. A faixa etária mais afetada foi entre 20-39 anos, seguida por indivíduos entre 40-59 anos. Os municípios mais atingidos foram Serro, Sabinópolis e Belo Horizonte. Um total de 34 óbitos (39,5%) foram registrados. Dentre os fatores que podem estar relacionados com a ocorrência dos casos destacam-se a atividade de trabalho desenvolvida pelos indivíduos e o íntimo contato com ambientes de mata. A proximidade a locais de mata aumenta a exposição dos indivíduos a áreas com possível ciclo de transmissão silvestre da FA. Os municípios de Serro e Sabinópolis encontram-se em uma área de transição entre Cerrado e Mata Atlântica, com fragmentos florestais descontínuos e com a maioria da população residindo em áreas rurais, e em Belo Horizonte a existência de áreas verdes pode favorecer a emergência de novos casos. A circulação do YFV é complexa, sendo alterada por fatores ambientais e interações entre hospedeiros e vetores, assim a emergência de novos casos é difícil de ser prevista, como em 2016 e 2017, com 487 casos confirmados no estado. Diante disso, resalta-se a importância da vigilância epidemiológica da FA e a necessidade de estratégias adequadas e eficazes para a vacinação.

**Palavras-chave:** Febre Amarela, SINAN, epidemiologia, fatores de risco, vigilância epidemiológica.

**Apoio Financeiro:** Capes, CNPq, UFMG.



## TRABALHOS SELECIONADOS PARA PÔSTER

02/10/2017 – 17:45

### ÁREA: AMBIENTAL

Número: 089

#### EFEITO DA ADUBAÇÃO FOSFATADA SOBRE A DIVERSIDADE DA COMUNIDADE BACTERIANA DE MILHO

Abreu, C.S.<sup>1</sup>; Gomes, E.A.<sup>2</sup>; Oliveira, J.C.M.D.<sup>1</sup>; Silva, U.C.<sup>3</sup>; Oliveira, C.A.<sup>2</sup>; Coelho, A.M.<sup>2</sup>; Lana, U.G.P.<sup>2</sup>; Santos, V.L.<sup>3</sup>; Góes-Neto, A.<sup>1</sup>; Stoianoff, M.A.R.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Micologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. <sup>2</sup>Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. <sup>3</sup>Laboratório de Microbiologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. E-mail: crisiaabreu@gmail.com

Micro-organismos solubilizadores de fósforo (MSP) podem ser utilizados como alternativa para otimizar a eficiência na utilização de fósforo (P), principalmente por serem eficientes na bioassolubilização de rochas fosfáticas no sistema solo-planta. Este trabalho objetivou investigar o perfil da comunidade bacteriana rizosférica e não rizosférica de milho, cultivado com diferentes fontes de fosfato. O experimento de campo foi conduzido utilizando-se delineamento em blocos casualizados com 4 repetições, sendo os tratamentos constituídos das adubações de P no plantio: Super Fosfato Triplo (SFT), Fosfato de Rocha Itafós (FRI), Fosfato Reativo Bayóvar (FRB) e tratamento testemunha sem adição de fosfato. Foram coletadas amostras de solo rizosférico e não rizosférico do milho no estádio de floração. O DNA extraído do solo foi amplificado utilizando *primers* para o gene ribossomal 16S. Os amplicons foram sequenciados na plataforma MiSeq da Illumina e comparados com banco de dados para inferir a taxonomia. Os menores e maiores valores de riqueza de OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais) observadas foram, respectivamente, com SFT no solo não rizosférico e controle no solo rizosférico. De acordo com o índice de Chao1, a menor e maior riqueza de espécies foi observada, respectivamente, para SFT no solo não rizosférico e no tratamento controle do solo rizosférico. Para o nível taxonômico de filo, observou-se predominância de Proteobacteria em todas as amostras, o que pode ser explicado pelo fato do filo Proteobacteria ser um dos maiores do domínio Bacteria, incluindo mais de duzentos gêneros e consequentemente uma maior diversidade, além de abundância. Estes resultados sugerem que tanto a riqueza quanto a abundância relativa de OTUs observadas são similares em cada um dos grupos formados.

**Palavras-chave:** metabarcoding, metagenômica, comunidade microbiana, ecologia.

**Apoio financeiro:** CAPES, Embrapa Milho e Sorgo, UFMG, CNPq, FAPEMIG.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 090**

**RESISTÊNCIA DA MICROBIOTA CUTÂNEA À CONTAMINAÇÃO POR ARSÊNIO EM FUNÇÃO DO ESTILO DE VIDA DE ANUROS DO QUADRILÁTERO FERRÍFERO**

Cordeiro, I. F.<sup>1</sup>; Fonseca, N. P.<sup>1</sup>; Felestrino, É. B.<sup>1</sup>; Caneschi, W. L.<sup>1</sup>; Pires, M. R. S.<sup>2</sup>, Moreira, L. M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Genômica e Interação Bactérias Ambiente, Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, UFOP, Ouro Preto, MG. <sup>2</sup>Laboratório de Zoologia dos Vertebrados, Departamento de Biodiversidade, Evolução e Meio Ambiente, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, UFOP, Ouro Preto, MG. E-mail: [isabella.fercod@gmail.com](mailto:isabella.fercod@gmail.com)

Os anfíbios são vulneráveis às características do ambiente onde vivem, tais como temperatura, pH, disponibilidade de água, radiação, nutrientes e contaminantes. Dentre os contaminantes mais agressivos estão os metais pesados e metaloides, e isso tem direta relação com a permeabilidade destes compostos pelo tecido cutâneo desses animais. Dessa forma, anfíbios que habitam locais contaminados devem apresentar microbiota cutânea resistente aos contaminantes ali presentes, e tal microbiota pode estar associada a sobrevivência dos anfíbios nessas condições. O presente trabalho procurou analisar a resistência ao arsênio da microbiota associada ao tecido cutâneo de anfíbios anuros encontrados na Estação Ecológica do Tripuí, região naturalmente contaminada por esse metaloide e inserida no Quadrilátero Ferrífero. Objetivou-se também, discutir que fatores poderiam modular o perfil da comunidade microbiana e a relação microbiota e hospedeiro. Um total de 328 isolados bacterianos foi obtido a partir de 21 indivíduos de sete espécies (*Bokermannohyla nanuzae*, *Hypsiboas faber*, *Ischnocnema izecksohni*, *Oolygon luizotavioi*, *Oolygon tripui*, *Rhinella crucifer* e *Vitreorana uranoscopa*), capturadas em diferentes microambientes no interior da EET. Os resultados mostraram um maior número de isolados, maior resistência ao arsênio e maior capacidade de formação de biofilme das bactérias associadas a anuros que apresentam maior contato com a água durante seu período reprodutivo, justamente o meio que apresenta maiores níveis desse contaminante. Estes resultados permitem inferir que a água atua como um mediador na manutenção ou estabelecimento da microbiota cutânea dos anuros e que a adaptação desses anfíbios em tal ambiente possa ter direta relação com uma microbiota especializada, possivelmente decorrente de um elaborado processo co-evolutivo entre as espécies.

**Palavras chaves:** Anfíbios, metaloide, comunidade microbiana, biofilme.

**Apoio financeiro:** Projeto BIGA e FAPEMIG.



## **RESUMOS**

**Número: 091**

### **PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE FENOL A PARTIR DE AMOSTRAS DE AQUÍFERO CONTAMINADO POR CREOSOTO**

Brito, M.Z<sup>1</sup>; Castanon, F.S<sup>1</sup>; Santos, V.L.<sup>1</sup>

Laboratório de Microbiologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. E-mail (s): mah\_briito@hotmail.com; fscastanon@gmail.com; [vlsantos@icb.ufmg.br](mailto:vlsantos@icb.ufmg.br).

O creosoto é um óleo formado por uma mistura complexa de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e compostos fenólicos. Seu uso na preservação de madeiras levou a contaminação de solos e aquíferos; e como seus compostos são tóxicos e cancerígenos, o tratamento destas áreas é essencial, podendo ser usadas técnicas como a biorremediação. O objetivo deste estudo foi prospectar bactérias degradadoras de fenol a partir de um aquífero contaminado com creosoto usando o método de enriquecimento. Foram isoladas 33 bactérias, que pelo método de Espectrometria de Massa - MALDI-TOF foram atribuídas a 7 gêneros: *Pseudomonas* (45%), *Serratia* (18%), *Bacillus* (15%), *Enterobacter* (6%), *Pseudochrobactrum* (3%), *Alcaligenes* (3%) e *Comamonas* (3%). Estas foram avaliadas quanto ao crescimento (DO a 600 nm) e degradação de fenol (DO a 270 nm) após cultivo em meio com 5 e 10 mmol/L. As maiores médias de crescimento e degradação foram observadas no cultivo com 5mmol/L. Nesta concentração, os isolados *T9P1/2* e *T9P2/5* de *Pseudomonas aeruginosa* *T9P1/2*, *Serratia marcescens* *T9P1/3*, *P. taiwanensis* *T9P6/3*, *Bacillus cereus* *T9P9/1*, *Alcaligenes* sp. B/4 e *Comamonas* sp. B/5 apresentaram as maiores biomassas. Também 10 dos 33 isolados degradaram fenol com taxas de remoção entre 61% e 92% em 5 mmol/L de fenol e entre 12% e 18% no meio com 10 mmol/L. Nos ensaios com 5 mmol/L de fenol, *Alcaligenes* sp. B/4 apresentou o maior percentual de degradação (92%) a uma taxa de degradação volumétrica de 6 mg/L.h, enquanto *P. aeruginosa* *T9P3/2* se destacou nos ensaios com 10mmol/L (28% e 3,8 mg/L.h). A produção de biossurfactantes foi avaliada pelo índice de emulsificação ( $E_{24}$ ) e atividade surfactante, com destaque para *S. marcescens* *T9P1/3* com  $E_{24}$  de 77% em 5 mmol/L e *P. putida* *T9P4/2* com 72% em 10 mmol/L de fenol, enquanto a tensão superficial do meio foi reduzida de 67,8 para até 41 mN/m. Os dados indicam o potencial de uso dos isolados degradadores na biorremediação de áreas contaminadas com compostos fenólicos.

**Palavras chave:** Biorremediação, creosoto, fenol, HPAs

**Apoio Financeiro:** Vale S.A, Fapemig



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 092**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA DE CONSUMO HUMANO DE COMUNIDADES RURAIS DE VISCONDE DO RIO BRANCO-MG**

Lima, M.O.S.<sup>1</sup>; Baptista, E.B.<sup>2</sup>; Paiva, R.R<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Biomédica pela Universidade Presidente Antônio Carlos – UNIPAC – Juiz de Fora – MG. <sup>2</sup> Farmacêutica, Professora do Curso de Farmácia da Universidade Presidente Antônio Carlos – UNIPAC, Doutora. <sup>3</sup> Biólogo na empresa Cesama e Mestre em Ecologia. E-mail: [marcelle\\_lima18@hotmail.com](mailto:marcelle_lima18@hotmail.com)

A água constitui a solução fundamental para a vida. Sua presença é essencial para os processos de digestão, absorção, circulação, lubrificação e excreção que ocorrem no organismo. O objetivo deste trabalho foi analisar amostras de água de comunidades rurais do município de Visconde do Rio Branco, Minas Gerais, nos parâmetros físico-químicos e microbiológicos. Foram analisadas oito amostras de água, sendo sete de poços e uma de mina, destinadas ao consumo humano em oito propriedades rurais diferentes. Utilizou-se o método do Teste de substrato cromogênico enzimático - Colitag™ para determinação de coliformes totais e *Escherichia coli* e o método de plaqueamento em profundidade para contagem de bactérias heterotróficas. As propriedades foram visitadas e um questionário, contendo 11 questões, foi aplicado aos proprietários para saber qual a opinião deles sobre a qualidade da água por eles consumidas. Os resultados mostraram que todas as amostras analisadas estão impróprias para o consumo, apresentaram coliformes totais, portanto com indicativo de contaminação fecal e 75% confirmaram presença de *Escherichia coli*. A Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde estabeleceu como padrão de potabilidade, para a água destinada ao consumo humano, a ausência de *Escherichia coli* em 100 mL de água. As bactérias ExPEC desenvolve doença fora do intestino humano. Todas as amostras de água analisadas apresentaram caráter ácido podendo desenvolver vários tipos de doenças. Pode-se concluir que as águas analisadas das comunidades rurais de Visconde do Rio Branco não apresentaram boa qualidade. Como a população que consome essa água não tem outra fonte de abastecimento como alternativa, a tendência é que continuem usando essa água até que outras medidas sejam feitas.

**Palavras chave:** Análise físico-química, Análise microbiológica, *Escherichia coli*, Qualidade da água



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 093**

### **CO-INOCULAÇÃO COM *Bacillus* E *Azospirillum* E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE RAÍZES DE MILHO.**

<sup>1</sup>Ribeiro, V.P.; <sup>2</sup>Rodrigues, R.A.L.; <sup>3</sup>Carvalho, C.G.; <sup>4</sup>Oliveira, K.H.D.; <sup>5</sup>de Sousa, S.M.; <sup>6</sup>Marriel, I.E.;  
<sup>7</sup>Gomes, E.A.; <sup>8</sup>Lana, U.G.P.; <sup>9</sup>Oliveira, C.A.

<sup>1,2,6,9</sup>Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do solo, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.  
<sup>3,4,5,7,8</sup>Núcleo de Biologia Molecular, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. E-mail: vitypalhares18@hotmail.com

As bactérias que promovem o crescimento das plantas (PGPB) e melhoram o rendimento e a qualidade das culturas são fundamentais para a agricultura sustentável. Os inoculantes microbianos são compostos principalmente por microrganismos capazes de promover o crescimento das plantas através de mecanismos, como o crescimento radicular. No entanto o conhecimento do efeito de inoculantes contendo duas ou mais cepas de PGPB combinadas ainda é limitado. O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito da co-inoculação de *Bacillus* (Bac) e *Azospirillum* (Azo) em plantas de milho cultivadas em solução nutritiva. Quatro estirpes de bactérias, pertencentes à coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo, foram cultivadas em meio LB líquido separadamente e em combinações. As culturas enriquecidas foram centrifugadas, ressuspensas em NaCl 0,85% para a concentração final de  $10^7$  unidades formadoras de colônias (UFC) / ml. Após a germinação das sementes em papel de filtro as plântulas foram cultivadas em solução nutritiva de Hoagland durante sete dias. Após esse período, as raízes foram imergidas nas suspensões bacterianas durante seis horas e transferidas para bandejas contendo a mesma solução nutritiva por mais dez dias. Em seguida, as raízes foram fotografadas e analisadas morfologicamente, utilizando-se os softwares rootreader2d e whinrhizo. Os resultados mostraram que um dos isolados de *Bacillus* (Bac2) e a combinação e Azo1xAzo2 melhoraram significativamente o crescimento da raiz (comprimento da raiz, superfície total da raiz, área superficial das raízes finas e peso seco). Outras combinações bacterianas (por exemplo, Bac2xAzo1, Bac2xAzo2, Bac1xBac2) também mostraram efeitos positivos na morfologia da raiz do milho e no peso seco das raízes, indicando o potencial dessas bactérias isoladas e em combinações para serem testadas novamente como bioinoculantes de milho em condições de estufa e campo para planta promoção do crescimento.

**Palavras-chave:** P-solubilizante, fixação de nitrogênio, microrganismos, crescimento radicular

**Apoiado financeiro:** Embrapa, INCT / CNPq, FAPEMIG, CAPES.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 094**

### **POTENCIAL DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO MILHO (*ZEA MAYS*) PARA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL E COLONIZAÇÃO RADICULAR**

Silva, D. R. C da<sup>1</sup>; Fernandes, A. C.<sup>1</sup>; Silva, U.C.<sup>1</sup>; Oliveira, C. A.<sup>2</sup>; Santos, V.L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG- dalianeregis@gmail.com, Belo Horizonte, MG

<sup>2</sup>Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

O milho é um dos mais importantes cereais cultivados em escala mundial com produtividade dependente de insumos agrícolas. Uma forma de diminuir esta dependência é o uso de inoculantes baseados em bactérias promotoras do crescimento vegetal. Neste estudo, 63 isolados da rizosfera e endofíticos de milho foram avaliados quanto à capacidade de biocontrole, produção de sideróforos e de compostos tensoativos e colonização radicular. A atividade antagonista foi testada por meio de confronto direto contra fungos patogênicos, *Fusarium verticillioides* e *Stenocarpella macrospora*, destacaram-se os isolados 50, 52 e 2111 do gênero *Bacillus*. Contra a bactéria *Pantoea ananatis*, utilizou-se o método da sobrecamada e *Erwinia* sp. 4, *Enterobacter* sp. 18 e *Bacillus* sp. 47 apresentam resultados positivos. Para a produção de sideróforos, utilizou-se a inoculação em caldo King B por 72h e a detecção pelo método de Cromo Azurol. Destacaram-se *S. marcescens* 2112 e *B. megaterium* 50, com produção máxima de 45,75 µmol/L. Também foi avaliada a produção de tensoativos após crescimento em meio mineral acrescido de glicose 5% pela determinação da atividade emulsificante (E24) de tolueno e redução da tensão superficial do meio (TSM). Todos os isolados produziram compostos tensoativos, com valores E24 de até 75%, observado para *Klebsiella* sp 1. 57 reduziram a TSM, sendo que *P. putida* 81 reduziu de 66,30 para até 27 mN/m. A produção das biomoléculas foi avaliada após precipitação do sobrenadante com etanol, e variaram de 0,16 a 1,57 g/l. Nos ensaios de colonização, a densidade bacteriana (UFC/g) nas raízes de grãos de milho germinados inoculadas com suspensão bacteriana foi medida nos tempos de 2, 24 e 48h. Destacaram-se *Klebsiella* sp. 1, *Enterobacter* sp. 30, *S. marcescens* 85, com média de  $5 \times 10^{10}$  UFC/g de raiz. Os resultados obtidos indicam que as linhagens que se destacaram nos parâmetros analisados são candidatas a testes de validação do potencial de colonização e crescimento vegetal *in vivo*.

**Palavras-chave :** biocontrole, colonização radicular, milho, bactéria

**Apoio Financeiro:** Fapemig, CNPq, Embrapa e Capes



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 095**

### **AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO E DEGRADAÇÃO DO CREOSOTO POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE UM REATOR BIOLÓGICO**

Santos, M.A<sup>1</sup>; Júlio, A.D.L<sup>1</sup>; Castanon, F.S<sup>1</sup>; Santos, V.L.<sup>1</sup>

Laboratório de Microbiologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. E-mail (s): [mariaguilar.bio@gmail.com](mailto:mariaguilar.bio@gmail.com); [alinejulio19@yahoo.com.br](mailto:alinejulio19@yahoo.com.br); [fscastanon@gmail.com](mailto:fscastanon@gmail.com); [ylsantos@icb.ufmg.br](mailto:ylsantos@icb.ufmg.br).

O creosoto é um óleo formado por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e compostos fenólicos, amplamente utilizado na preservação de dormentes de linhas férreas. Isso resultou em grandes contaminações de solos e aquíferos e como os HPAs são tóxicos e cancerígenos, o tratamento destas áreas é essencial. O uso da biorremediação para este fim tem sido uma alternativa mais sustentável quando comparada a outros tratamentos, uma vez que é baseada em processos biológicos para degradação dos poluentes. O objetivo deste estudo foi avaliar bactérias isoladas de um biorreator de leito fluidizado de uma empresa de tratamento de dormentes (ETD) desativada e localizada no Espírito Santo, quanto ao potencial de degradação de creosoto e seus componentes. O isolamento das bactérias foi realizado pelo método de enriquecimento utilizando o meio BHB mais extrato de levedura (0,2%), suplementado com creosoto (0,25%) por 3 cultivos semanais sucessivos. As 49 bactérias obtidas foram identificadas pela técnica de Maldi-Tof e distribuídas em 10 gêneros diferentes: *Achromobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Brevundimonas*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Rhodococcus*, *Escherichia*, *Sphingomonas* e *Staphylococcus*. Nos ensaios de degradação, as bactérias foram crescidas por 21 dias a 150 rpm/30°C em meio contendo creosoto (0,25%) como única fonte de carbono e analisadas quanto ao crescimento (D.O. a 600nm) e concentração de HPAs (CG-MS). 53% das bactérias cresceram no meio, com DO acima de 0,5, e cinco delas, R304-1, *Sphingomonas* SP R103-1 e R105, *Bacillus cereus* R301-2 e *P. putida* R301-5 degradaram todos os 16 HPAs presentes no creosoto em alguma proporção. No geral, os compostos degradados em maior percentual foram acenafteno, fenantreno, dibenzofurano e fluoreno, com médias gerais correspondendo a 27,8%, 17,6%, 14,5% e 11 %, respectivamente. Os dados sugerem que as bactérias têm potencial de uso em formulações de inoculantes para biorremediação das áreas impactadas com creosoto.

**Palavras chave:** Biorremediação, creosoto, HPAs

**Apoio Financeiro:** Fapemig, Vale S.A



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 096**

### **IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE BACTÉRIAS MESÓFILAS AERÓBIAS EM SILAGEM DE MILHO**

Souza, A. V. L.<sup>1</sup>; Gaspar, S. S.<sup>1</sup>; Souza, J. R.<sup>1</sup>; Carvalho, B. F.<sup>1</sup>; Schwan, R. F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia Ambiental e Industrial, Setor Microbiologia, Departamento de Biologia, UFLA, Lavras, MG, Brasil. Email: [alinevazlaranjeira@gmail.com](mailto:alinevazlaranjeira@gmail.com)

O processo de ensilagem visa a conservação da forragem buscando a preservação do valor nutricional sendo o milho uma das forrageiras utilizadas. A microbiota da silagem desempenha papel fundamental na qualidade do processo de conservação da forragem. Entretanto, o conhecimento da microbiota das silagens produzidas em clima tropical pode ser considerado rudimentar diante dos poucos dados disponíveis. A utilização de uma abordagem polifásica possibilita uma identificação mais precisa. Este trabalho teve como objetivo quantificar enterobactérias e bactérias do ácido láctico e identificar bactérias mesófilas aeróbias presentes em silagem de planta inteira de milho, obtida em uma fazenda comercial no município de Bom Sucesso, Minas Gerais. A amostra foi submetida a diluições seriadas, as quais foram plaqueadas em superfície nos meios de cultura: AN (Ágar Nutriente), MRS (De Man, Rogosa & Sharpe) e EMB (Eosin Mehylene Blue). A morfologia celular foi observada através do teste de Gram, a caracterização fisiológica e bioquímica foi feita a partir de testes de catalase, oxidase, motilidade e esporulação. Os isolados foram analisados de acordo com seu perfil proteico, utilizando a técnica de Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Testes complementares foram realizados: Voges-Proskauer, hidrólise de amido, crescimento em diferentes temperaturas e diferentes concentrações de NaCl e fermentação de carboidratos. A população de bactérias no meio MRS foi de  $1,06 \times 10^5$  UFC g<sup>-1</sup>. Não houve crescimento no meio EMB. Após a caracterização morfológica das colônias crescidas em AN foram obtidos 22 isolados. As espécies identificadas e suas respectivas populações foram *Bacillus simplex* ( $8,6 \times 10^3$  UFC g<sup>-1</sup>), *Bacillus oleronius* ( $6,5 \times 10^4$  UFC g<sup>-1</sup>), *Bacillus altitudinis* ( $1 \times 10^3$  UFC g<sup>-1</sup>), *Lysinibacillus boronitolerans* ( $1 \times 10^3$  UFC g<sup>-1</sup>) e *Lysinibacillus massiliensis* ( $1,7 \times 10^3$  UFC g<sup>-1</sup>). Na amostra houve predominância de bactérias formadoras de esporos.

**Palavras chave:** *Bacillus*, Identificação polifásica, MALDI-TOF MS.

**Apoio financeiro:** CNPq, CAPES, FAPEMIG



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 097**

**DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS FOLIARES DO GÊNERO *Colletotrichum* sp. EM SERINGUEIRA (*Hevea brasiliensis*) BASEADA NA REGIÃO ITS E EM DIFERENTES MÉTODOS DE ANÁLISES**

Martins, C.S.F<sup>1, 2</sup>; Tomé, L. M. R.<sup>2</sup>; Fonseca, P. L. C.<sup>2</sup>; Castro, A.<sup>2</sup>; Cunha, M. C.<sup>2</sup> GÓES-NETO, A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro Universitário de Belo Horizonte - UNIBH, Belo Horizonte-MG

<sup>2</sup> Laboratório de Biologia Molecular e Computacional de Fungos - LBMCF, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, Belo Horizonte-MG. Email: [camilasantos.martins@hotmail.com](mailto:camilasantos.martins@hotmail.com)

*Hevea brasiliensis* (seringueira) é a melhor produtora de látex e borracha natural. *Colletotrichum* sp. é um importante táxon pertencente ao Reino Fungi, e espécies deste gênero podem atuar como fitopatogênicas, e como fungos endofíticos em seringueira. Apesar de apresentar grande importância econômica, poucos são os estudos relacionados a diversidade desses fungos em *H. brasiliensis*. Assim, este trabalho tem como objetivo identificar os fungos endofíticos do gênero *Colletotrichum* que ocorrem em *H. brasiliensis* por meio da amplificação da região do Espaçador Interno Transcrito (ITS) e de diferentes métodos de análises (BLAST, MOTHUR e ABGD). Para isso, foram coletadas indivíduos de seringueiras de duas áreas, Parque Nacional de Anavilhas (AM, Brasil) e Floresta Nacional de Caxiuanã (PA, Brasil). A partir da coleta, foram isolados por método de cultivo, 270 fungos, sendo que destes, 111 foram identificados como *Colletotrichum* sp. Por meio de análise comparativa no blast, os 111 isolados de *Colletotrichum* foram identificados como pertencentes a sete espécies: *C. gloeosporioides* (80), *C. fructicola* (4), *C. queenslandicum* (3), *C. acutatum* (1), *C. alatae* (10), *C. siamense* (5) e *C. aenigma* (1). Sete isolados foram identificados apenas ao nível de gênero. Para verificar as prováveis espécies (OTUs) foi feita a análise de agrupamento com o programa MOTHUR, que identificou sete prováveis OTUs/espécies. Por meio da análise de Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD), que classifica/agrupa o conjunto de sequências em espécies hipotéticas, todas as sequências foram agrupadas em apenas um grupo/espécie hipotética. Com os resultados obtidos, pode-se concluir que a análise por meio do blast e do MOTHUR, mostraram resultados idênticos, classificando as seqüências em sete espécies, contudo, estas divergiram do resultado do ABGD, por isso, é necessária a amplificação de outras regiões do DNA, para uma melhor delimitação das espécies.

**Palavras chave:** *Hevea brasiliensis*, Fungos endofíticos, *Colletotrichum*, diversidade.

**Apoio Financeiro:** National Science Foundation (NSF) e CAPES



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 098**

### **IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS DO GÊNERO *Trichoderma* sp., UM IMPORTANTE TÁXON RELACIONADO A ADAPTABILIDADE DE *Hevea brasiliensis***

Silva, A. C.<sup>1</sup>; Cunha, M. C.<sup>1</sup>; Tomé, L. M. R.<sup>1</sup>; Fonseca, P. L .C.<sup>1</sup>; Góes-Neto, A.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia Molecular e Computacional de Fungos, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. E-mail: [alleficastro@gmail.com](mailto:alleficastro@gmail.com)

A seringueira (*Hevea brasiliensis*), é conhecida por sua importância como a maior produtora mundial de látex para a obtenção de borracha natural. Na América Latina, seu cultivo é ameaçado pela doença conhecida como “Mal das Folhas Sulamericana” (SALB). Assim como nas demais plantas, *H. brasiliensis* possui uma micota a ela associada. O gênero *Trichoderma* sp., vem sendo estudado nas plantas nativas de seringueira e é relatado na proteção contra patógenos, o que demonstra sua importância como potencial agente de controle biológico para a SALB. Poucos são os estudos de identificação deste gênero, e por isso, este trabalho tem como objetivo a identificação das espécies de *Trichoderma* sp.. Para esse estudo foram utilizadas 5 folhas saudáveis de 5 indivíduos de *H. brasiliensis* coletados da Floresta Nacional de Caxiuanã. De cada folha, um folíolo foi retirado e essas amostras tiveram o seu DNA total extraído e amplificadas pela região interna do espaçador transcrita, e para mais duas regiões que correspondem ao genes constitutivos da actina (ACT) e do fator de elongamento 1 alfa (TEF). Após a amplificação, estas foram submetidas ao sequenciamento pelo método de Sanger e posteriormente analisadas e identificadas para a caracterização das espécies que compõem a diversidade de fungos do gênero *Trichoderma* sp. associados a seringueira. No total, 48 isolados pertencem ao gênero *Trichoderma* sp. dos quais 16 foram amplificados para as regiões ACT e TEF. Com as sequências, foi verificado que os isolados pertencem às espécies *Trichoderma lentiforme* (10), *T. harzianum* (4) e *T. spirale* (1). Um isolado não pôde ser identificado com as três regiões sequenciadas, por isso, serão padronizados e amplificados outros genes, como o da calmodulina. A partir da identificação de todas as espécies isoladas neste trabalho, serão feitos testes de antagonismo contra o principal patógeno de seringueira.

**Palavras-chave:** *Hevea brasiliensis*, fungos endofíticos, metagenômica, diversidade.

**Apoio financeiro:** NSF, CNPq, FAPEMIG.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 099**

### **DESCRIÇÃO DE *Hyphopichia buzzinii* f.a., sp. nov. E *Hyphopichia homilentoma* comb. nov., O TELEOMORFO DE *Candida homilentoma***

Roedel, L.<sup>1</sup>; Santos, A. R. O.<sup>1</sup>; Groenewald, M.<sup>2</sup>; Smith, M. T.<sup>2</sup>; Lara, C. A.<sup>1</sup>; Góes-Neto, A.<sup>1</sup>; Jacques, N.<sup>3</sup>; Casaregola, S.<sup>3</sup>; Lachance, M.A.<sup>4</sup> and Rosa, C. A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia, ICB, C.P. 486, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brasil. <sup>2</sup>CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands. <sup>3</sup>Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, CIRM-Levures, Université Paris-Saclay, 78350, Jouy-en-Josas, France. <sup>4</sup>Department of Biology, University of Western Ontario, N6A 5B7, London, Ontario, Canada. E-mail: [lucasroedel3@gmail.com](mailto:lucasroedel3@gmail.com)

Leveduras podem ser encontradas na natureza em associação com material vegetal vivo e em decomposição. Esses *habitats* são comumente ricos em D-xilose, um açúcar cuja bioconversão é de grande interesse para a produção de etanol e xilitol. Assim, estudos de diversidade de leveduras são importantes para revelar espécies com potencial biotecnológico, além de elucidar a filogenia desses organismos. Durante estudos desse tipo realizados na Mata Atlântica e Floresta Amazônica brasileiras, foram encontrados 11 isolados de *Candida homilentoma*. Quando foi feito o cruzamento com a linhagem tipo, foram formados ascósporos. Além disso, foram obtidos três isolados de uma nova espécie, próxima a *C. homilentoma*. O objetivo desse trabalho foi descrever a nova combinação e a nova espécie de leveduras do gênero *Hyphopichia*, caracterizando-as fisiologicamente e filogeneticamente, além de testar suas capacidades de fermentação de D-xilose. Para a análise filogenética, o DNA total foi extraído e a região *barcode* D1/D2 do RNA ribossomal foi amplificada e sequenciada. As sequências foram montadas no programa MEGA7 e uma árvore que inclui os outros representantes do gênero foi montada. Para o estudo da fisiologia, foi feita a esporulação de *C. homilentoma* e os esporos foram fotografados. Os isolados da nova espécie foram testados em réplica fisiológica e suas células foram fotografadas. A fermentação de D-xilose foi testada em meio líquido e a produção de etanol e xilitol e o consumo de açúcar foram medidos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A partir dos resultados obtidos, foi possível reclassificar a espécie *C. homilentoma* para o gênero *Hyphopichia* como uma nova combinação e foi proposta a transferência das outras espécies de *Candida* do clado *Hyphopichia* para este gênero. O nome *H. buzzinii* foi proposto para acomodar a nova espécie descrita. Além disso, foi mostrada a capacidade dessas duas espécies de converter D-xilose em etanol e xilitol.

**Palavras-chave:** nova espécie, levedura, *Hyphopichia*, fermentação, bioconversão, D-xilose

**Apoio financeiro:** CNPq, FAPEMIG e Natural Science and Engineering Council of Canada (MAL).



## **RESUMOS**

**Número: 100**

### **VIROMA FOLIAR DE *Hevea brasiliensis* USANDO SEQUENCIAMENTO DE PEQUENOS RNAs E PCR DIGITAL**

**Fonseca, P.L.C.<sup>1</sup>; Aguiar, E.R.G.R.<sup>2</sup>; Badotti, F.<sup>3</sup>; Oliveira, T.F.P.<sup>1,4</sup>; Fonseca, A.A.<sup>4</sup>; Vaz, A.B.M.<sup>1,5</sup>; Tomé, L.M.R.<sup>1</sup>; Abrahão, J.S.<sup>1</sup>; Marques, J.T.<sup>2</sup>; Trindade, G.S.<sup>1</sup>; Chaverri, P.<sup>6</sup>; Góes-Neto, A.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Química, Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET-MG), Belo Horizonte, MG, 30480-000, Brasil. <sup>4</sup>LANAGRO/MG – Laboratório Nacional da Agricultura, Ministério da Agricultura, (MAPA), Pedro Leopoldo, MG, 33600-000, Brasil. <sup>5</sup>Faculdade de Minas (FAMINAS), Belo Horizonte, MG, 31744-007, Brasil. <sup>6</sup>Department of Plant Science and Landscape Architecture, University of Maryland, College Park, MD 20742, USA. **Email:** camargos.paulaluize@gmail.com

*Hevea brasiliensis* (seringueira) é uma planta de importância econômica e social devido à alta qualidade do látex produzido. Esta planta é suscetível a muitas doenças causadas por fungos, como o Mal de Folhas Sulamericano (SALB). Entretanto, pouco se sabe sobre as infecções virais. O único vírus descrito infectando *H. brasiliensis* foi relatado há mais de 30 anos (*Carlavirus*). Com o advento das técnicas independentes de cultivo, foi possível caracterizar novas espécies virais. Um exemplo é o sequenciamento de pequenos RNAs (sRNAs) que já foi usado com sucesso para identificar e caracterizar vírus em diversos organismos, incluindo plantas. Neste estudo, usamos o sequenciamento de sRNAs para investigar possíveis vírus associados á folhas e alburno coletadas de indivíduos de *H. brasiliensis* da região amazônica brasileira. Utilizando esta estratégia, foi possível identificar e caracterizar sequências pertencentes a um novo vírus que nunca descrito em seringueiras. O vírus de RNA fita simples polaridade positiva (ssRNA) foi denominado *Hevea brasiliensis virus* (HBrV) em referência ao seu hospedeiro. Apesar do nosso dado indicar que o vírus está replicando, o mesmo não parece provocar nenhuma sintomatologia a planta, e por isso, pode se tratar de um vírus persistente. Análises filogenéticas baseadas na poliproteína de replicação mostraram que o HBrV é relacionado ao vírus *Grapevine fig fleck virus* (GFKV), a única espécie reconhecida pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV) pertencendo ao gênero *Maculavirus*. A presença do HBrV foi confirmada por técnicas de quantificação relativa e absoluta usando PCR em tempo real (qPCR) e PCR digital (ddPCR) respectivamente. O vírus caracterizado neste trabalho é o segundo descrito em seringueiras. Nossos resultados destacam a necessidade de novos estudos de viroma em *H. brasiliensis* para a detecção, identificação, quantificação e melhor compreensão entre as relações desempenhadas por vírus no seu hospedeiro.

**Palavras chave:** Pequenos RNAs, identificação viral em seringueira, *Hevea brasiliensis* vírus (HBrV), vírus persistentes.

**Apoio Financeiro:** NSF, CAPES



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 101**

### **DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS E EPIFÍTICOS FOLIARES DE SERINGUEIRAS (*Hevea brasiliensis*) NATIVAS DA AMAZÔNIA ORIENTAL POR METAGENÔMICA**

Silva, A. C.<sup>1</sup>; Cunha, M. C.<sup>1</sup>; Tomé, L. M. R.<sup>1</sup>; Fonseca, P.L.C.<sup>1</sup>; Góes-Neto, A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia Molecular e Computacional de Fungos, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. **E-mail:** alleficastro@gmail.com

A seringueira (*Hevea brasiliensis*), é conhecida por sua importância econômica como a maior produtora de látex natural. Assim como nas demais plantas, *H. brasiliensis* possui uma micota a ela associada, constituída por fungos endofíticos e epifíticos. Os fungos endofíticos colonizam o interior de tecidos vegetais por pelo menos um período do seu ciclo de vida sem provocar sintomatologia. Por sua vez os fungos epifíticos residem na superfície dos tecidos vegetais. Ambos os grupos de fungos influenciam na adaptabilidade da planta, por isso o estudo de diversidade é de grande importância. Uma vez que vários fungos não crescem em meios de cultivo, a identificação dessa micota pode ser possível pela técnica de metagenoma. Para esse trabalho, foram coletados 5 folhas saudáveis de 5 indivíduos de *H. brasiliensis* da Floresta Nacional (FLONA) de Caxiuanã. De cada folha, um folíolo foi retirado e essas amostras tiveram o seu DNA total extraído e amplificadas pela região interna transcrita (ITS), considerada o código de barras primário de fungos. Após a purificação das sequências amplificadas, estas foram submetidas ao sequenciamento pelo sequenciador Miseq (illumina) e posteriormente analisadas e identificadas para a caracterização das espécies que compõem a diversidade de fungos de *H. brasiliensis*. Os resultados apontaram para a existência de 953 diferentes táxons de fungos da micota da planta hospedeira, sendo 196 em âmbito de gênero, 125 em âmbito de família, 96 em âmbito de ordem e 606 em âmbito de subclasse. Além disso. Interessantemente, alguns dos táxons identificados estavam presentes em indivíduos de *H. brasiliensis* de ambos locais de coleta, constituindo portanto o grupo “core”, ou central, de fungos associados à planta, os quais podem ser imprescindíveis à adaptabilidade da seringueira.

**Palavras-chave:** *Hevea brasiliensis*, fungos endofíticos, fungos epifíticos, metagenômica, diversidade.

**Apoio financeiro:** NSF, CNPq, FAPEMIG.



## **RESUMOS**

**Número: 102**

### **PROSPECÇÃO DE BACTERIÓFAGOS COM POTENCIAL DE APLICAÇÃO PARA CONTROLE MICROBIANO EM TORRES DE RESFRIAMENTO DE REFINARIAS DE PETRÓLEO**

ZANETTI, D.G.<sup>1</sup>; LIMA, B.M.S<sup>1</sup>; SANTOS, V.L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Microbiologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, MG. E-mail: deborazanetti.91@gmail.com

Sistemas de resfriamento são comuns em indústrias que necessitam de arrefecimento em seus processos. Porém, estes podem ser colonizados por bactérias que além de afetar a eficiência do processo geram danos aos equipamentos e tubulações por corrosão e formação de biofilme. A utilização de fagos mostra-se como uma alternativa biotecnológica promissora para o controle de populações microbianas sésseis e planctônicas. Objetivou-se conhecer a comunidade fágica e sua utilização no controle de bactérias de uma refinaria em Minas Gerais. Amostras foram coletadas na Lagoa de Ibirité que abastece a refinaria e de um ponto entre duas lagoas de aeração da refinaria. Os bacteriófagos foram isolados através de três métodos: (1) por precipitação de 400mL das amostras utilizando Polietilenoglicol (PEG); (2) por filtração de 500mL das amostras em membranas de 0,22µm; (3) por enriquecimento das amostras a partir de 100mL das amostras acrescido do mesmo volume meio LB, seguido de incubação e filtração em membrana de 0,22µm. As bactérias foram isoladas a partir da diluição e plaqueamento por Spread Plate das amostras coletadas. Foram obtidas 64 diferentes morfotipos bacterianos e três extratos a partir do método de PEG e filtração. O extrato obtido pelo método de filtração foi testado para espectro de hospedeiro em 25 morfotipos através do método de sobrecamada e a presença de placas de lise foi considerada como positivo e a ausência como negativo. Do total, 21 bactérias foram identificados como hospedeiros para o extrato, demonstrando um sucesso de infecção de 84%. Para testar a atividade bacteriolítica as 21 bactérias foram acompanhadas quanto ao crescimento pela aferição da densidade ótica 600nm por 1,4,8,16 e 24h. O extrato foi eficiente na diminuição da densidade ótica acompanhada em no mínimo 0,9% e máximo de 95,1% após 24h de incubação. Estes dados iniciais indicam que, as estratégias de tratamento baseados em fagos podem ser alternativas eficientes para o controle microbiano.

**Palavras-chave:** Bacteriófagos, Torres de resfriamento, Biofilme

**Apoio Financeiro:** Petrobrás e CNPq



## **RESUMOS**

**Número: 103**

### **UBIQUITOUS GIANTS: A PLETHORA OF GIANT VIRUSES FOUND IN BRAZIL AND ANTARCTICA**

Ana Cláudia dos S. P. Andrade<sup>1</sup>; Thalita S. Arantes<sup>1</sup>; Rodrigo A. L. Rodrigues<sup>1</sup>; Talita B. Machado<sup>1</sup>; Fábio Pio Dornas<sup>1</sup>; Melissa F. Landell<sup>2</sup>; Furst, C<sup>3</sup>; Luiz G. A. Borges<sup>4,5</sup>; Lara A. L. Dutra<sup>6</sup>; Gabriel Almeida<sup>6</sup>; Giliane de S. Trindade<sup>1</sup>; Ivan Bergier<sup>7</sup>; Walter Abrahão<sup>8</sup>; Iara A. Borges<sup>1</sup>; Juliana R. Cortines<sup>9</sup>; Danilo Bretas de Oliveira<sup>10</sup>; Erna G. Kroon<sup>1</sup>; Jônatas S. Abrahão<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratório de Diversidade Molecular, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Brazil.

<sup>3</sup>Departamento de Patologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Maruípe, Brazil

<sup>4</sup>Department of Microbiology, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY, USA.

<sup>5</sup> Instituto do Petróleo e dos Recursos Naturais (IPR), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>6</sup>Department of Biological and Environmental Sciences, University of Jyväskylä, Jyväskylä, Finland

<sup>7</sup>Embrapa Pantanal, Brazil

<sup>8</sup>Universidade Federal de Viçosa, Brazil

<sup>9</sup>Departamento de Virologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>10</sup> Faculdade de Medicina, Universidade Federal do dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Brazil

Since the discovery of giant viruses infecting amoebae in 2003, many dogmas of virology have been revised and the search for these viruses has been intensified. Over the last years several new groups of these viruses have been discovered in various types of samples and environments. In this work, we describe the isolation of 68 giant viruses of amoeba obtained from 776 environmental samples from Brazil and Antarctica. It was analyzed was analyzed: 495 soil samples, 124 water samples, 140 sewage samples and 17 capybara samples. Isolated viruses were identified by hemacolor staining, PCR assays and electron microscopy (scanning and/or transmission). A total of 64 viruses belonging to the *Mimiviridae* family were isolated (26 from lineage A, 13 from lineage B, 2 from lineage C and 23 from unidentified lineages), from different types of samples, including marine water from Antarctica, thus being the first mimiviruses isolated in this extreme environment to date. Furthermore, a new marseillevirus was isolated from sewage sample along with two pandoraviruses and a new cedratvirus (the third to be isolated in the world so far), adding new members to the putative Megavirales order. Although water samples have shown the highest number of isolated virus (34 isolates), we found a higher diversity of viral groups in sewage samples (26 isolates). In the water samples only *Mimiviridae* family viruses (12 of lineage A, 13 of lineage B and 9 unidentified) were identified, while in the sewage samples were found besides *Mimiviridae* (9 of lineage A, 2 of lineage C and 11 unidentified), 1 marseillevirus, 1 cedratvirus and 2 pandoraviruses. Our results reinforce the importance of prospective studies in different environmental samples, therefore improving our comprehension about the circulation and diversity of these viruses in nature.

**Financial support:** Capes, FAPEMIG, CNP, PROANTAR.



## RESUMOS

Número: 104

### THE ANALYSIS OF MIMIVIRUS KV MAJOR CAPSID GENE AND TRANSCRIPTS HIGHLIGHTS A DISTINCT PATTERN OF GENE EVOLUTION AND SPLICING AMONG LINEAGE A MIMIVIRUSES

Paulo Victor Miranda Boratto<sup>1†</sup>, Fábio Pio Dornas<sup>1†</sup>, Lorena Christine Ferreira da Silva<sup>1</sup>, Rodrigo Araújo Lima Rodrigues<sup>1</sup>, Graziele Pereira Oliveira<sup>1</sup>, Erna Geessien Kroon<sup>1</sup>, Juliana Reis Cortines<sup>2</sup>, Bernard La Scola<sup>3</sup>, Jônatas Santos Abrahão<sup>1\*</sup>

Giant viruses belonging to the *Mimivirus* genus (*Mimiviridae* family) were first described in 2003, during the characterization of a pathogenic amoeba-associated microorganism that was related to outbreaks of nosocomial pneumonia in a hospital in Bradford, England. Since then a huge diversity of related virus has been described from many different countries and environments. As soon as new giant viruses has been discovered, these organisms started to be phylogenetically classified based on sequences of the gene related to the DNA polymerase B protein. This gene is conserved among the different viral members but presents enough differences to separate them in three different lineages (A, B and C). These viruses, however, present a set of other conserved genes that are not so well explored in the literature. In this work we analyze the structure, syntheny and phylogenetic relationships of the major capsid gene (another hypothetically conserved gene shared by the *Mimiviridae* members) in different giant viruses isolates, including mimivirus KV, a recent virus isolated by our group. By using phylogenetic analyses and comparing the order of the intronic and exonic regions that compose the MCP gene of these giant viruses we observed a distinct pattern of genetic organization and gene evolution involving KV and other mimiviruses, even among members of the lineage A to which KV belongs. These differences also reflected in how the MCP mRNA is processed by splicing. By sequencing the mature transcripts of the MCP gene in both APMV (type-species among mimiviruses and member of the lineage A) and KV we have observed many differences in terms of content and organization, suggesting that in the Brazilian isolate this gene is processed in a different form. Finally, taken together, our results enabled us to highlight the MCP gene as a new interesting genetic marker that could also help in future studies involving the isolation and characterization of other giant viruses.

**Keywords:** mimivirus, *Acanthamoeba*, capsid, phylogeny, evolution

**Financial support:** CNPq, CAPES, FAPEMIG



## **ÁREA: BIOTECNOLOGIA**

**Número: 105**

### **CRISPR/CAS9: A NEW ANTIMICROBIAL APPROACH**

Arantes, A.J.R.<sup>1</sup>; Tagliaferri, T.L.<sup>1</sup>; Pereira, M.P.M.<sup>1</sup>; Vilela, L.F.F.<sup>2</sup>; Mendes, T.A.O.<sup>3</sup>; Santos, S.G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, Departamento de Microbiologia, ICB, UFMG.

<sup>2</sup>Laboratório de Biologia Sintética e Biomiméticos, Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG.

<sup>3</sup>Laboratório de Biologia Sintética e Biologia de Sistemas, Departamento de Bioquímica, UFV.

Discovered as a protection mechanism against viral infections in archaea and bacteria, the CRISPR/Cas9 system has been adapted to applications on genetic engineering fields. One of the forthcoming uses of the system involves the prokaryotic cells which held its discovery. Using this approach, a strong research field has been constructed on employing the system to combat multidrug resistant bacteria and reduce the virulence of those organisms. Here we present a literature review about the advances in this antimicrobial approach to the CRISPR/Cas9 system. The technology can target accurately genetic sequences due to matching specificity between the designed gRNA and the target DNA, followed by Cas9 mediated double-strand break. While targeting chromosomal genes may lead to cell death due to lack of efficient genetic repairing, targeting plasmidial genes can promote gene knockout maintaining cell viability. Considering its characteristics, studies are exploring the antimicrobial activity promoted by the system which presents more selectivity than the conventional therapies both *in vivo* and *in vitro* experiments. Consequently, it can also limit horizontal transfer of functional genes usually responsible for the spreading of resistance and virulence factors among bacteria. Moreover, the system can be employed on multidrug resistant strains aiming genes responsible for this characteristic, producing re-sensitization or selective killing according to the molecular target (chromosome or plasmid). Analogous procedures are applied to virulence genes and its hosts. The technique efficiency depends on effective delivery of the reprogrammed system, which is done mainly by bacteriophages, electroporation or microinjection. Wide antimicrobial application of the CRISPR/Cas9 system still depends on the resolution of some problems that arouse during its utilization: off-target effects; selection of resistant strains; virulence genes transference when using phages as delivery system.

**Keywords:** Antibiotic resistance; CRISPR/Cas9; Multidrug resistance; Re-sensitization; Antimicrobials.



## RESUMOS

Número: 106

### O PRIMEIRO GENOMA COMPLETO DE *SERRATIA LIQUEFACIENS*, ASSOCIADA A PLANTA DE CAMPOS FERRUGINOSOS, REVELOU DISTINTOS MECANISMOS ADAPTATIVOS PARA SOBREVIVÊNCIA EM AMBIENTE INÓSPITO

Washington Luiz Caneschi<sup>1</sup>, Érica Barbosa Felestrino<sup>1</sup>, Renata de Almeida Barbosa Assis<sup>1</sup>, Camila Gracyelle de Carvalho Lemes<sup>1</sup>, Isabella Ferreira Cordeiro<sup>1</sup>, Natasha Peixoto Fonseca<sup>1</sup>, Morghana Marina Villa<sup>1</sup>, Izadora Tabuso Vieira<sup>1</sup>, Luciana Hiromi Yoshino Kamino<sup>2</sup>, Flávio Fonseca do Carmo<sup>2</sup>, Angélica Sanchez<sup>1</sup>, Camila Carrião Machado Garcia<sup>1,3</sup>, Nalvo Almeida<sup>4</sup>, Jesus Aparecido Ferro<sup>5</sup>, Maria Inês Tiraboshiro Ferro<sup>5</sup>, Alessandro de Melo Varani<sup>5</sup>, Rafael Marini<sup>5</sup>, Vera Lúcia dos Santos<sup>6</sup>, Ubiana de Cássia<sup>6</sup>, João C Setubal<sup>7,8</sup>, Leandro Marcio Moreira<sup>1,3</sup>.

<sup>1</sup>Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB), Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brazil; <sup>2</sup> Instituto Prístino, Belo horizonte, MG, Brazil; <sup>3</sup> Departamento de Ciências Biológicas (DECBI), Instituto de Ciências Exatas e Biológicas (ICEB), Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto, MG, Brazil; <sup>4</sup>Faculdade de Computação (FACOM), Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil; <sup>5</sup> Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Departamento de Tecnologia, SP, Brazil; <sup>6</sup>Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, (UFMG), Belo horizonte, MG, Brazil; <sup>7</sup>Departamento de Bioquímica (DB), Instituto de Química (IQ), Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil; <sup>8</sup> Biocomplexity Institute, Virginia Tech, Blacksburg, VA, USA.

*Serratia* é um gênero de bactéria gram negativa, responsável por doenças nosocomiais, embora já tenham sido isoladas de amostras de água e alimentos. Espécies de *Serratia* associada à plantas têm sido relatadas como potenciais promotoras de crescimento vegetal. Neste trabalho, relatamos o primeiro genoma completo sequenciado de *Serratia liquefaciens* cepa FG3 (*S/FG3*) isolada de planta do Quadrilátero Ferrífero. *S/FG3* possui um cromossomo circular de 5,7 Mpb contendo 5398 sequências codificantes (CDSs) e dois plasmídeos de 160 e 120 Kpb, capazes de codificar 179 e 146 CDSs, respectivamente. Análise filogenômica de *S/FG3* foi determinada a partir da comparação de 31 espécies de *Serratia* com genomas completamente sequenciadas. Foram agrupados num mesmo clado FG3, *S. liquefaciens* FDAARGOS 125, *S. liquefaciens* HUMV21, *S. liquefaciens* ATCC 27592 e *S. proteamaculans* 568 (*Sp568*), sendo apenas esta última associada com plantas. Análises genômicas foram realizadas por meio da plataforma RAST somente para os genomas que se agruparam no clado citado. Estes genomas compartilham um total de 3998 famílias de proteínas (*core*), com destaque para 516 genes únicos (*singletons*) encontrados na cepa *S/FG3*. Embora não tenham sido encontrados genes associados com sistema secretório tipo III em *S/FG3*, genes relacionados à degradação de protocatecuato foram identificados apenas nas cepas *S/FG3* e *Sp568*. FG3 apresenta aproximadamente 4 vezes mais genes de fagos e profagos que as demais cepas investigadas, além de genes relacionados à tiolação de RNA e DNA. Para esta última função os genes foram encontrados em uma região de transferência lateral. Uma vez desafiada em condições de elevadas concentrações de metais e peróxidos, o DNA de *S/FG3* se manteve íntegro, demonstrando a importância destes genes lateralmente adquiridos para a manutenção e da sobrevivência desta bactéria às condições hostis impostas pelo solo e intempéries do quadrilátero ferrífero.

**Palavras chaves:** Quadrilátero Ferrífero, *Serratia liquefaciens*, planta, genoma completo, análise genômica.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 107**

**NOVO PEPTÍDEO LIGANTE-ESPECÍFICO A PROTEÍNAS DE CÉLULAS TUMORAIS MAMÁRIAS**

**BORGES, D. S.<sup>1</sup>; SILVA, A. G.<sup>1</sup>; SANTOS, P. S.<sup>2</sup>; ALMEIDA, L. O.<sup>1</sup>; ALVES, D. A.<sup>1,2</sup>; DIAS, B. H. S.<sup>1</sup>; GOULART, L. R.<sup>2</sup>; ARAÚJO, T. G<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Genética e Biotecnologia, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia. <sup>2</sup>Laboratório de Nanobiotecnologia, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia. E-mail: [daaysborges@gmail.com](mailto:daaysborges@gmail.com)

O câncer de mama (CM) é classicamente classificado em três subgrupos: positivo para receptores de estrogênio e / ou progesterona, HER2+ e tumores triplo negativos. O tratamento do CM é desafiador, uma vez que não inclui apenas a escolha correta da intervenção terapêutica, mas também a alta probabilidade de desenvolvimento da resistência à terapia adotada. Assim, entender as vias de sinalização responsáveis pela manutenção do câncer, as quais se orquestram durante o desenvolvimento tumoral, se faz necessário. Atendendo a este campo, a tecnologia de *Phage Display* emergiu como uma estratégia recombinante para seleção de peptídeos específicos que podem ser usados como ferramentas farmacêuticas no tratamento do CM. Este estudo teve como objetivo selecionar os peptídeos que reconhecem os alvos tumorais da mama. As proteínas citoplasmáticas e de membrana das linhagens celulares MCF10A (não-tumorigênica), MCF-7 (fenótipo luminal) e MDA-MB231 (fenótipo basal triplo negativo) foram extraídas e utilizadas no processo de *biopanning*. A seleção negativa foi realizada em proteínas MCF10A. Após três rodadas, as partículas de fagos foram coletadas para amplificação e purificação. Os ensaios de *Phage-Elisa* foram realizados e o clone de pLF6 identificou diferencialmente alvos proteicos da linhagem de fenótipo luminal ( $p < 0,05$ ). Análises de bioinformática foram realizadas para predição do peptídeo exibido, e, posteriormente, identificar possíveis mecanismos envolvidos no início e progressão tumoral. Considerando o elevado número de pacientes resistentes à terapia hormonal, nossos resultados não só ajudam na compreensão do câncer de mama, mas também abrem novas possibilidades para o tratamento dos pacientes, uma vez que o peptídeo selecionado pode, futuramente, ser destinado a composição de novas terapias.

**Palavras-chave:** Câncer de mama, *Phage Display*, *Biopanning*.

**Apoio Financeiro:** CNPq, Capes e FAPEMIG.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 108**

### **ANÁLISE GENÔMICA DE *Alcaligenes faecalis* MC250: UMA RIZOBACTÉRIA ADAPTADA A CAMPOS RUPESTRES FERRUGINOSOS**

Érica Barbosa Felestrino<sup>1</sup>, Renata de Almeida Barbosa Assis<sup>1</sup>, Camila Gracyelle de Carvalho Lemes<sup>1</sup>, Isabella Ferreira Cordeiro<sup>2</sup>, Natasha Peixoto Fonseca<sup>1</sup>, Morghana Marina Villa<sup>3</sup>, Izadora Tabuso Vieira<sup>3</sup>, Luciana Hiromi Yoshino Kamino<sup>4</sup>, Flávio Fonseca do Carmo<sup>4</sup>, Camila Carrião<sup>1,5</sup>, João Carlos Setubal<sup>6</sup>, Nalvo Almeida Junior<sup>7</sup> e Leandro Marcio Moreira<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB), Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brasil. <sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Biomas Tropicais, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brasil. <sup>3</sup>Laboratório de Genômica e Interação Bactérias Ambiente, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brasil. <sup>4</sup>Instituto Prístino, Belo Horizonte, MG, Brasil. <sup>5</sup>Departamento de Ciências Biológicas (DECBI), Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Campus Morro do Cruzeiro, Ouro Preto, MG, Brasil. <sup>6</sup>Instituto de Química, Universidade de São Paulo. <sup>7</sup>Faculdade de Computação, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Bactérias do gênero *Alcaligenes* são gram-negativas, aeróbicas, encontradas em solo, água, águas resíduárias e associadas a plantas. A estirpe *Alcaligenes faecalis* Mc250 (AfMc250) foi isolada da planta endêmica de campos rupestres ferruginosos, *Mimosa calodendrum*, e devido as peculiaridades de sua origem, objetivou-se investigar seu potencial como possível promotora de crescimento vegetal através do sequenciamento de seu genoma. Foram obtidos 3.278.030 pb que codificam para 3769 regiões. Para estabelecer variações na composição de seu genoma, uma análise comparativa com outros quatro genomas de espécies de *Alcaligenes* foi estabelecida. Esta comparação revelou que apesar de terem sido isolados de ambientes muito distintos, todas as espécies investigadas possuem alta correlação genômica, compartilhando um core de 2146 famílias de proteínas ortólogas. Análise detalhada do genoma demonstrou que AfMc250, assim como as outras estirpes, não possui genes associados com produção de auxina, fixação de nitrogênio ou que codificam para enzimas com potencial solubilizador de fosfato, o que corrobora resultados empíricos. Entretanto, merece destaque a via completa de desnitrificação, uma intrincada rede de vias associadas com degradação de compostos fenólicos, além de genes associados com síntese de ácido cianídrico e sideróforos. Dados também confirmados empiricamente. O genoma também possui um elevado repertório de genes associados com internalização e metabolismo de metais, sulfato/sulfonato, metabolismo de cisteína, estresse oxidativo e reparo de DNA, o que corrobora as condições ambientais de onde fora isolada. Além disso, AfMc250 resiste a elevadas concentrações de arsênio e consegue remover este metóide do meio, propiciando melhoria no crescimento de plantas de tomate testadas na presença deste composto. Por estes resultados, AfMc250 se mostrou bastante promissora em futuras investigações quanto a seus potenciais biotecnológicos.

**Palavras chaves:** *Alcaligenes faecalis* Mc250, *Mimosa calodendrum*, biofertilizantes, biorremediadores, biocontroladores.

**Apoio:** FAPEMIG, CAPES e CNPQ



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 109**

**CRISPR-CAS9: O SISTEMA IMUNE DE BACTÉRIAS**

GUIMARÃES, M. V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Estudante de Microbiologia Aplicada, UFMG, Belo Horizonte, MG. Email: mateusvitorino@gmail.com

CRISPR-Cas9 é um mecanismo natural de defesa das bactérias (sistema imune) que as protege contra infecções virais. Descoberta na década de 80, após a observação de uma sequência incomum nos genomas bacterianos, posteriormente esta sequência foi denominada de: “agrupados de curtas repetições palindrômicas regularmente interespacadas”, do inglês CRISPR. Estas regiões são cópias idênticas do DNA invasor, inseridas na região CRISPR no DNA bacteriano após primeiro contato com bacteriófagos. O mecanismo de defesa começa, quando uma bactéria detecta a presença de um genoma viral (exógeno), a bactéria armazena este DNA estranho para se “resguardar” contra futuras infecções. Após o contato inicial ela produz uma proteína chamada de Cas-9, esta é uma enzima exonuclease, que constantemente examina o cromossomo bacteriano a procura do DNA invasor. Ao encontrá-lo ela é capaz de clivar e extrair precisamente a sequência invasora. A consequência deste mecanismo de defesa é o impedimento da replicação viral na célula procariota. Os objetivos da pesquisa foram caracterizar e descrever o mecanismo de defesa presente nas bactérias. O embasamento desta pesquisa foi a coleta de dados de revisão literária, cujos recursos utilizados foram os de domínio público em que a informação manteve o caráter fidedigno dos fatos estudados e registrados. Portanto o fato de ser um mecanismo natural de defesa de bactérias torna-o de extrema precisão no momento da clivagem da sequência do DNA. Devido a milhares de anos de adaptações junto a infecções contra bacteriófagos e a sua respectiva co-evolução, este mecanismo vem tomado grandes proporções e avanços relacionados às pesquisas científicas de diversas áreas da biologia.

**Palavras-chave:** Crispr-cas9; Bactérias; Clivagem DNA; DNA Invasor.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 110**

### **INFLUÊNCIA DA UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE AÇÚCARES NO PH FINAL DA FERMENTAÇÃO DE EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA POR CULTURA LÁCTEA COMERCIAL.**

**VIEIRA, M.C.<sup>1,2</sup>; LACERDA, I.C.A.<sup>2</sup>; CARREIRA, R.L.<sup>3</sup>; FALEIRO,L.R.<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Alimentos, Escola de Nutrição, UFOP, Ouro Preto, MG. <sup>2</sup>Laboratório de Microbiologia Industrial e Biocatálise, Departamento de Alimentos, Escola de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte, MG. <sup>3</sup>Laboratório de Química de Alimentos, Departamento de Alimentos, Escola de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte, MG. <sup>4</sup>FAVENI, Venda Nova do Imigrante, ES. Brasil. E-mail: [michelechristinav@yahoo.com.br](mailto:michelechristinav@yahoo.com.br).

O extrato hidrossolúvel de soja (EHS) é um dos derivados da soja com grande potencial de aplicação em produtos fermentados devido a sua composição semelhante ao leite de vaca. Possui baixo custo e é de fácil obtenção. A fermentação do EHS permite melhorar as características do produto final, uma vez que os produtos da fermentação mascaram o sabor desagradável da soja e melhoram seu valor nutricional decorrente da redução de saponinas e fitatos. O EHS contém oligossacarídeos naturais como a rafinose e estaquiose, que são fermentáveis por bactérias lácteas. O objetivo deste estudo foi verificar a influência da adição de diferentes fontes de açúcares no pH final da fermentação do EHS por cultura comercial de iogurte YF-L812 (Chr. Hansen) após determinado tempo de incubação. Foram utilizados 4 tratamentos sendo: A1 (EHS 6% + 2% glucose de milho), A2 (EHS 6% + 2% de sacarose), A3 (EHS 6% + 2% de lactose) e A4 (controle contendo apenas EHS 6%). Todos os meios de fermentação foram esterilizados (121°C/15'), resfriados (40°C) e inoculados com 2,0 % da cultura YF-L812. Após a inoculação, foram incubados por 180 minutos a 41±0,5 °C, em banho maria. Após o período de incubação, observou-se formação de coágulo firme em todos os tratamentos. Os tratamentos A1 e A3 não apresentaram diferenças significativas entre si nos valores de pH ( $4,09 \pm 0,01$ ), assim como os tratamentos A2 e A4 ( $4,17 \pm 0,01$ ). Porém, foram encontradas diferenças significativas entre os dois grupos (A1/A3 e A2/A4). Portanto, conclui-se que a adição de glucose de milho e de lactose promoveu um maior declínio do pH, em comparação ao controle e a adição de sacarose não teve influência no pH alcançado. Observou-se ainda que a cultura comercial foi capaz de fermentar todos os meios, apresentando valores de pH abaixo daqueles comumente encontrados em fermentação de base láctea, demonstrando o potencial tecnológico do EHS adicionado ou não de fontes de açúcares.

**Palavras chave:** Fermentação, EHS, açúcares, pH.

**Apoio Financeiro:** CNPq e UFOP.



## RESUMOS

Número: 111

### APLICAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM PLANTAS: UMA ALTERNATIVA PARA MELHORIA DE CRESCIMENTO VEGETAL E RESISTÊNCIA A ARSÊNIO

VIEIRA, I. T.<sup>1</sup>; FELESTRINO, E. B.<sup>1</sup>; MOREIRA, L. M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Genômica e Interação Bactérias-Ambiente, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brasil.; <sup>2</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brasil.

Atividades como o uso de agroquímicos, processos industriais, mineração e consequente lixiviação de contaminantes podem causar danos ambientais como empobrecimento mineral do solo e contaminação de recursos hídricos. Frente a estes problemas, as bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCPs) se tornam uma potencial alternativa sustentável devido a seu potencial biorremediador e biofertilizante. Logo, o objetivo desse estudo foi testar o potencial de BPCPs na reversão fenótipos das plantas modelo tomate (*Lycopersicon esculentum*) e *Arabidopsis thaliana*, em condições de estresse arsênico e sob produção de fitormônio. Foram testadas dezesseis estípites bacterianas isoladas de diferentes plantas endêmicas do Quadrilátero Ferrífero-MG quanto a seus potenciais de biorremediação e biofertilização. Realizou-se ensaios *in vivo* com tomateiros crescidos em solo contaminado com arsenito ( $\text{As}^{+3}$ ) e arsenato ( $\text{As}^{+5}$ ) na presença e ausência de bactérias resistentes a esse metal, e ensaios com *Arabidopsis thaliana* na presença e ausência de bactérias produtoras de ácido indol acético (AIA). Os isolados nomeados 250 e 274, apresentaram porcentagens de remoção de 32% e 36% de  $\text{As}^{+3}$  *in vitro* respectivamente, e ambos com reversão de fenótipo em tomateiros na concentração de 2,5mM de  $\text{As}^{+3}$  e  $\text{As}^{+5}$ . O isolado nomeado 89 foi capaz de transformar  $\text{As}^{+5}$  em  $\text{As}^{+3}$ , além de remover 15% de  $\text{As}^{+5}$  em ensaio *in vitro*. No ensaio *in vivo*, a presença desse isolado demonstrou melhoria no crescimento das raízes de tomateiros na concentração de 2,5mM de  $\text{As}^{+5}$ . Esse isolado também se destacou pela capacidade de produção de AIA na ausência de triptofano, embora não tenha demonstrado melhoria no crescimento de *Arabidopsis thaliana*. Esse estudo apontou isolados que apresentam potencial biotecnológico para utilização como uma alternativa futura e ecológica em substituição aos agroquímicos, visando sua inoculação juntamente com plantas utilizadas comumente na agricultura para promoção do crescimento vegetal.

**Palavras-chave:** BPCPs; Biorremediação; Biofertilização; Arsênio; *Lycopersicon esculentum* e *Arabidopsis thaliana*.

**Apoio financeiro:** CNPq e PIBITI.



## **RESUMOS**

**Número: 112**

### **POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ISOLADOS BACTERIANOS OBTIDOS EM CAVERNAS DE CANGA DO QUADRILÁTERO FERRÍFERO**

Lemes, C. G. C.<sup>1</sup>; Villa, M. M.<sup>1</sup>; Felestrino, E. B.<sup>1</sup>; Kamino, L<sup>2</sup>. H. Y.; Carmo, F.F.<sup>2</sup>; Moreira, L. M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Genômica e Interação Bactérias-Ambiente, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brasil.; <sup>2</sup>Pesquisa e desenvolvimento de projetos, Instituto Prístino, Belo Horizonte, MG, Brasil.; <sup>3</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brasil. E-mail: camilalemes.mail@gmail.com

O Quadrilátero Ferrífero (QF) se destaca pela concentração de minério de ferro em seu solo, o que tem propiciado elevado extrativismo que se contrapõe à sua importância biológica. Nesta área, as cavernas de cangas apresentam-se como paisagens com características geomorfológicas distintas. Poucas destas cavernas foram catalogadas, e um número ainda mais reduzido foi incorporado em estudos biológicos. O objetivo deste trabalho foi verificar o potencial biotecnológico de bactérias cultiváveis obtidas em cavernas de canga. Para isso, foram coletados 50g de solo e teto de sete cavernas de canga, uma caverna de quartzito e uma amostra de solo externo às cavidades. As amostras foram lavadas em água estéril e diluídas em frações de 1:10 e 1:100. Em seguida, 100µl destas soluções foram plaqueados em placas de Petri contendo meio LB (pH 7, restritivo a fungos), mantidas a 28°C por 3 dias. As colônias com diferentes morfotipos foram isoladas e criopreservadas. 587 isolados foram obtidos e compõem o primeiro banco de isolados bacterianos de cavernas de canga. Estes isolados foram catalogados e crescidos em placas de 96 poços compondo matrizes de ensaios *in vitro* de inibição contra o *Staphylococcus aureus* - Sa (Gram+) e o fitopatógeno *Xanthomonas citri* - Xac306 (Gram-). Os resultados mostraram que 58 isolados (9,9%) foram capazes de inibir Sa, e 49 isolados (8,3%) foram capazes de inibir Xac306, dos quais 36 inibem ambos os patógenos. Os isolados que inibiram Xac306 *in vitro* foram avaliados quanto à manutenção deste potencial em ensaios *in vivo*. Nove isolados apresentaram redução entre 36% e 68% da lesão causada Xac306 quando co-inoculados em plantas de limão cravo, sem induzir resposta de hipersensibilidade quando inoculados sozinhos. Este trabalho retrata pela primeira vez que isolados bacterianos obtidos de cavernas de canga apresentam potenciais biotecnológicos negligenciados, além de permitir inserir no contexto de preservação um fator até então desconsiderado.

**Palavras-chave:** Cavidades naturais, microrganismos, biocontrole.

**Apoio financeiro:** FAPEMIG e CAPES.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 113**

### **ANTAGONISMO *in vitro* DE *Lactobacillus* ISOLADOS DE QUEIJOS MINAS ARTESANAIS DA SERRA DA CANASTRA-MG CONTRA *Listeria monocytogenes***

Valente, G. L. C<sup>1</sup>., Acurcio L. B.<sup>2</sup>, Brito, R. F.<sup>1</sup>, Nicoli, J. R.<sup>2</sup>, Souza, M. R.<sup>1</sup>, Silva, A. M.<sup>3</sup>, Penna, C. F. A. M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, MG. <sup>2</sup>Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG.

<sup>3</sup>Universidade Federal de São João del-Rei, Sete Lagoas, MG, Brasil. E-mail: gustlcv.vet@gmail.com

Probióticos são microrganismos que quando administrados em concentrações recomendadas promovem benefícios à saúde do hospedeiro. *Lactobacillus* é um dos principais gêneros relacionados com o potencial probiótico, porém, cada amostra deve ser analisada de forma isolada já que a característica é de natureza amostra-dependente. O antagonismo *in vitro* é uma análise que quantifica a inibição de um patógeno promovida pela bactéria testada. Baseado nisso, o objetivo do trabalho foi avaliar se *Lactobacillus* spp. isolados de queijo Minas artesanais (QMA) promovem antagonismo *in vitro* contra *Listeria monocytogenes* e comparar seu desempenho com probióticos disponíveis comercialmente. Os microrganismos utilizados no estudo foram *L. monocytogenes* ATCC 15313 (LM), *L. rhamnosus* (D1) e *L. plantarum* (B7) isolados de QMA da Serra da Canastra, seis amostras de *L. casei* e uma de *L. paracasei* isoladas de leites fermentados funcionais comerciais, e *L. rhamnosus* GG utilizado em formulações farmacêuticas amplamente comercializadas na América do Norte e Europa. O antagonismo foi avaliado pelo método *spot-on-the-lawn* em duplicata e em três repetições, em que 5µL dos lactobacilos ativados foram inoculados no centro de placas com ágar MRS, e após 48h de incubação as bactérias são eliminadas por tratamento com clorofórmio e luz UV. Em seguida, 10µL do inóculo de LM foram transferidos para tubos contendo ágar BHI semissólido, sendo o conteúdo vertido sobre as placas. Após 48h de incubação, mediu-se o halo de inibição formado entre os lactobacilos e as colônias de LM com paquímetro digital. B7 e D1 formaram halos médios (mm) de respectivamente 38,44 e 39,76, não demonstrando diferenças pelo teste de Kruskal-Wallis ( $P<0,05$ ) quanto aos diâmetros dos halos formados pelos probióticos. Conclui-se que B7 e D1 além de apresentarem um potencial de inibição satisfatório ( $>30\text{mm}$ ), demonstraram-se tão eficazes em inibir LM *in vitro* quanto amostras comerciais de probióticos.

**Palavras chave:** antagonismo, *Lactobacillus*, *Listeria monocytogenes*, probióticos, queijo Minas artesanal

**Apoio financeiro:** CNPq, CAPES e FAPEMIG.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 114**

### **EXPRESSÃO HETERÓLOGA E PURIFICAÇÃO DE PEPTÍDEO QUIMÉRICO CONSTITUIDO POR EPÍTOPOS DE TOXINAS DE *Loxosceles laeta***

Witt, A.S.A<sup>2</sup>; Olórtegui, C.D.C.<sup>1</sup>; Ávila, G.R.<sup>1</sup>; Ávila, R.A.M.<sup>3</sup>; Leal, H.G.<sup>2</sup>; Ferreira, D.S.M.<sup>2</sup>; Kalapothakis, E.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Imunoquímica de Toxinas Naturais, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. <sup>2</sup>Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. <sup>3</sup>Universidade do Extremo Sul Catarinense, Reitoria, Unidade Acadêmica Ciências da Saúde, Criciúma, SC. Email: asawitt1997@gmail.com

Loxoscelismo é considerado um problema de saúde pública no Brasil, causado por envenenamento pelas aranhas do gênero *Loxosceles*. Normalmente, o envenenamento por *Loxosceles sp* causa pouca ou nenhuma dor nas primeiras 2-3 horas, dificultando o diagnóstico e prolongando o tempo pré-tratamento. O veneno de *Loxosceles sp* é muito potente e dermonecrótico, podendo levar à morte se não neutralizado rapidamente. Muitos estudos buscam desenvolver melhores terapias antiveneno e melhor compreensão das toxinas do veneno de aranhas do gênero *Loxosceles*. Neste estudo, um peptídeo quimérico composto a partir de oito epítópos distintos de toxinas do veneno de *Loxosceles laeta* foi elaborado para a produção de anticorpos com potencial de neutralização das toxinas nativas da aranha encontrada na América do Sul. As sequências selecionadas foram inseridas em um vetor de expressão procariótico com adição de uma cauda de poli histidina para purificação. O gene para resistência a ampicilina foi incluído. Para a expressão heteróloga, a linhagem C41 DE3 de *Escherichia coli* foi utilizada. A linhagem contendo o vetor de expressão foi cultivada em LB-ágar contendo ampicilina (100 µg/ml) a 37°C overnight e uma colônia isolada foi inoculada em 10 ml meio 2XYT contendo ampicilina (100 µg/ml) a 37°C overnight. 100 µL da cultura foram inoculados em 1L de meio 2XYT com ampicilina (100mg) a 37°C sob agitação até atingir a OD 600 de 0.4-0.6. Então, a cultura foi induzida com IPTG [0.06mM] para expressão overnight. As células foram ressuspensas em tampão de purificação contendo guanidina [6M] e DTT [1mM] e lisadas por sonicação. O sobrenadante foi purificado com HisTrap HP column (GE Healthcare). A expressão e purificação da quimera de veneno de *L. laeta* foram confirmadas em SDS-PAGE. Futuramente, a quimera de veneno de *L. laeta* pode ser usada para melhoria do soro antiveneno de aranhas do gênero *Loxosceles*, devido a similaridades entre as toxinas dos venenos de espécies diferentes do mesmo.

**Palavras-chave:** *Loxosceles*, *Loxosceles laeta*,抗ígenos recombinantes, quimera, expressão heteróloga, purificação, veneno

**Apoio financeiro:** FAPEMIG, CAPES e CNPq.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 115**

### **EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA TOXINA Ts6 DE *Tityus serrulatus* E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL IMUNOGÊNICO**

Ferreira, DSM<sup>1</sup>; Biscoto, GL<sup>1</sup>; Leal, HG<sup>1</sup>; Mendes, BBRO<sup>1</sup>; Kalapothakis, E<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil  
E-mail: douglasales@outlook.com

O escorpião *Tityus serrulatus* é considerado o mais perigoso da América do Sul, e possui boa adaptação ao ambiente urbano, resultando em uma alta taxa de acidentes. Além da alta complexidade de proteínas e peptídeos, a peçonha do escorpião também possui neurotoxinas que podem mudar a permeabilidade de canais iônicos de células excitáveis, afetando sua função normal por meio da interação com canais de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>. A neurotoxina Ts6 possui 40 aminoácidos e interage com canais para potássio. Apesar de proteínas desta família possuírem um baixo valor toxicológico, quando associadas com toxinas de canal de Na<sup>+</sup>, agem sinergicamente, propiciando uma potente ação tóxica à peçonha. Alguns estudos foram desenvolvidos visando melhorar as terapias anti-veneno, e nosso grupo de pesquisa está envolvido na produção alternativa de soro utilizando proteínas recombinantes. Toxinas da peçonha do escorpião são isoladas, caracterizadas, clonadas e expressas. O objetivo deste trabalho foi clonar, expressar e purificar a toxina Ts6 em vetor bacteriano (*Escherichia coli*) para testar o seu potencial imunogênico e o potencial de neutralização do soro. Para isto, a sequência da toxina foi inserida no vetor de expressão. Para a expressão, a linhagem C43 de *E. coli* foi utilizada. Elas foram crescidas em placas LB e uma única colônia foi inoculada em meio LB e induzido com IPTG por 16 horas em temperatura ambiente. Depois deste tempo, o meio foi centrifugado e o pellet lisado. A purificação foi feita utilizando coluna Histrap (GE) e analisada por SDS-PAGE. A proteína recombinante foi utilizada para a produção de soro em coelho, e testes de ELISA mostraram reatividade do soro anti-Ts6 com a peçonha bruta do escorpião. O soro produzido foi utilizado para neutralização da peçonha e foi capaz de neutralizar efetivamente 1 DL<sub>50</sub> em camundongos. Estes tipos de testes são importantes para verificar o potencial de neutralização do soro e progredir no estudo da produção alternativa de soro anti-escorpiônico.

**Palavras-chave:** *Tityus serrulatus*, Ts6, expressão heteróloga, soro

**Apoio financeiro:** CNPq, CAPES



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 116**

### **PURIFICAÇÃO DE UM PEPTÍDIO ANTIMICROBIANO COM AÇÃO ANTAGONISTA CONTRA O ENTEROPATÓGENO *Shigella sonnei***

**Moreira J. S.<sup>1</sup>; Oliveira, J. S.<sup>2</sup>; Dias, M. G. M. A.<sup>1</sup>; Borges, M. H.<sup>3</sup>; Santos, J. L.<sup>3</sup>; Magalhães P.P.<sup>1</sup>; Farias L. M.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG; <sup>2</sup>Laboratório de Sinalização Celular e Nanobiotecnologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. <sup>3</sup> Serviço de Proteômica e Aracnídeos, Divisão de Plataformas Tecnológicas, Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG. Brasil. E-mail: jaquelinesmoreira@yahoo.com.br.

Um dos primeiros relatos de peptídos antimicrobianos (AMPs) data de 1939, quando Dubos observou a ação antagonista produzida por *Bacillus* sp. contra o agente infeccioso *Pneumonoccus* sp., substância posteriormente isolada e nomeada garamicina. Após esta data, diversos AMPs foram identificados, o que possibilitou um maior entendimento das relações microbianas e também a utilização de tais compostos na produção de fármacos de uso humano e animal e na indústria alimentícia. *Shigella* é um agente infeccioso da família Enterobacteriaceae que acomete principalmente crianças, podendo levar a quadros graves de diarreia, para os quais antibioticoterapia é recomendada. Resistência antimicrobiana já foi descrita para amostras de *Shigella*. O objetivo deste estudo foi purificar um peptídio antimicrobiano produzido por *Shigella sonnei* com ação isoantagonista. O extrato proteico intracelular da amostra produtora obtido pela precipitação com sulfato de amônio 75% p/v foi cromatografado em colunas de afinidade - heparina e troca iônica - Mono Q. As frações ativas, identificadas pelo método de sobrecamada, foram selecionadas e analisadas por espectrometria de massas. Os dados demonstram a purificação de um peptídio antimicrobiano com massa molecular de 1,5kDa ativo contra outra amostra de *S. sonnei*. O próximo passo é o sequenciamento da substância ativa purificada. A síntese de AMPs pelo enteropatógeno *S. sonnei* contra amostra da mesma espécie pode representar vantagem competitiva importante, em especial, em ambiente densamente colonizado, como o intestino. O AMP detectado apresenta potencial de aplicação, podendo ser candidato a novo fármaco.

**Palavras Chave:** Peptídios antimicrobianos, *Shigella sonnei*, atividade antagonista.

**Apoio Financeiro:** FAPEMIG, CAPES, CNPq e PRPq/UFMG.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 117**

### **BIO - PRODUÇÃO E ANÁLISE DA EFICÁCIA DE CORANTES NATURAIS PARA OBSERVAÇÃO MICROSCÓPICA DE FUNGOS FILAMENTOSO E LEVEDURIFORME.**

Santos, K.J; Mingote, W.A.R; Suriani, A.M; César, F.G; Fernandes, D.O; Casteluber, M.C.F

Universidade do Estado de Minas Gerais – Unidade Ibirité – Minas Gerais, Brasil.  
Laboratório de Microbiologia Aplicada, Universidade do Estado de Minas Gerais-(Unidade Ibirité).  
E-mail: kelvinpinheiro32@hotmail.com

O Brasil apresenta uma grande variedade de frutos e sementes que podem ser utilizados para extração de corantes, e são utilizados principalmente nas indústrias têxtil e de cosméticos. O presente estudo avaliou a eficiência de corantes extraídos de frutos da biodiversidade brasileira para coloração de fungos, com o objetivo de desenvolver corantes naturais com a mesma qualidade daqueles sintéticos já utilizados nas colorações laboratoriais. Os frutos escolhidos para a produção do extrato foram o urucum (*Bixa orellana*), jenipapo (*Genipa americana*) e o hibisco (*Hibiscus rosa-sinensis L.*), devido aos relatos de sua utilização por comunidades indígenas para corar pele e tecidos. Para a produção dos extratos, 30 gramas da polpa do jenipapo, das sementes do urucum e flores de hibisco. As porções de sementes de urucum e polpa de jenipapo foram maceradas e diluídas em 35 mL da solução álcool 70% (v/v), já a de flor de hibisco, foi diluída em 100 mL de álcool 70 % v/v, uma vez que planta encontrava-se desidratada, logo após os extratos foram filtrados e 24 horas depois centrifugados utilizando o sobre nadante com corante. Os fungos utilizados para os testes foram os das espécies: *Rhizopus sp.* e *Aspergillus sp.*, foram cultivados em Agar Saboraud pela técnica de microcultivo. As lâminas foram preparadas com os respectivos corantes e observadas em microscópio óptico nas objetivas de 10x e 40x. Como controles negativo foram utilizados corantes Azul de Lactofenol-algodão e Azul de Metileno para corar os mesmos fungos a fim de comparar os corantes naturais dos sintéticos. Em sua eficiência como corante para micro organismos os corantes naturais foram tão eficazes para observação microscópica de fungos quanto os corantes sintéticos. Os resultados obtidos podem contribuir para o desenvolvimento de aulas práticas de biologia em escolas onde a obtenção de corantes sintéticos é dificultada, propondo fusão entre teoria e prática nos estudos de microbiologia nas escolas.

**Palavras-chave:** Jenipapo, Urucum, Fungos, Corantes, Coloração, Escolas.

**Instituição de fomento:** PAEx.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 118**

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES SOLUÇÕES DE SAIS NA PRODUÇÃO DE AMILASES POR *Aspergillus sp.* (F6.1.3) EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA**

Jordana de J. Silva<sup>(1,\*)</sup>, Larissa R. Gomes<sup>(1)</sup>, Karla C.<sup>(1)</sup> e Patrícia N. C. Souza<sup>(1)</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia do Instituto de Engenharia, Ciência e Tecnologia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - IECT/UFVJM - Janaúba-MG.  
E-mail: [jordanasilva007@gmail.com](mailto:jordanasilva007@gmail.com)

As amilases estão entre as mais importantes enzimas utilizadas nas indústrias alimentícias, de fermentação, papel, têxtil, farmacêutica, médica, dentre outras. Sabe-se que muitos microrganismos possuem um imenso potencial na degradação de material contendo amido, e, portanto, várias espécies já foram relatadas por apresentar capacidade de produzir grandes quantidades dessas enzimas. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de amilases pelo fungo filamentoso *Aspergillus sp.* (F6.1.3), isolado de folhas de bananeira (*Musa sp.*), em fermentação submersa utilizando diferentes soluções de sais. Para isso, o fungo foi inoculado em placas de Petri contendo meio Batata-Dextrose-Agar (BDA) por 7 dias, de onde foi retirado um disco micelial de 6 mm de diâmetro que foi inoculado Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de quatro meios de cultura, utilizando 5 g/L de casca de batata-doce (previamente secas a 80 °C e triturados) como a fonte de carbono: (1)SR (RIZZATTI et al., 2001) (Modificado); (2)Khanna (KHANNA et al., 1995)(Modificado); (3)Czapeck (WISEMAN, 1975)(Modificado), (4)CP (PEIXOTO et al., 2003). Estes meios foram incubados a 30°C durante 5 dias, posteriormente foram filtrados e a atividade enzimática foi dosada pelo método do DNS descrito por MILLER (1959) à 60°C, utilizando-se o amido, na concentração de 1%, como substrato, em tampão acetato de sódio, pH 5,0. Também foi calculada a atividade específica que consiste na razão entre a atividade enzimática (U/mL) e a quantidade de proteínas (mg/mL) contida na amostra, sendo que esta última foi dosada pelo método descrito por LOWRY et al. (1951). Entre os meios de cultura testados, com o SR obteve-se a maior atividade enzimática (atividade enzimática de 58,39 U/mL e atividade específica de 103,1 U/mg). Sendo assim, conclui-se que o isolado *Aspergillus* F6.1.3 produz grandes quantidades de amilases nestas condições, instigando assim, pesquisas futuras afim de otimizar sua produção em maiores escalas.

**Palavras chave:** enzimas, fungos filamentosos, fermentação.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 119**

### **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS ÀS PLANTAS DO CERRADO MINEIRO PARA A PRODUÇÃO DE ÓLEOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

Soares<sup>1</sup>, J. M.; Alves<sup>1</sup>, L. S. O.; Silva<sup>1</sup>, L. M. da; Vieira<sup>1</sup>, M. L. A; Rezende<sup>1</sup>, F. A. G. G.

<sup>1</sup> Laboratório de Microbiologia, Departamento de Química, CEFET-MG, Belo Horizonte, MG. E-mail: [jumax.soares@gmail.com](mailto:jumax.soares@gmail.com)

O Cerrado é considerado o segundo maior bioma encontrado em território nacional, é o que apresenta uma maior riqueza de espécies e ocupa mais da metade do estado de Minas Gerais. O pequi (Caryocar brasiliense Camb.) é uma espécie vegetal típica do cerrado muito utilizada pela população. Possui diversos usos e destaca-se o poder antifúngico encontrado em suas folhas. Sabendo-se das propriedades ainda não muito exploradas dos fungos endofíticos associados a plantas do cerrado brasileiro, este trabalho teve o objetivo de avaliar o potencial antimicrobiano de fungos endofíticos associados a folhas de pequi coletadas em Minas Gerais. Para isso, fez-se a coleta de 60 folhas de 30 indivíduos diferentes de *C. brasiliense*, 2 de cada exemplar. Realizou-se a desinfestação superficial das folhas, o plaqueamento de fragmentos retirados das mesmas em meio BDA suplementado com cloranfenicol e o isolamento de seus fungos associados. Foram obtidos 184 isolados de fungos filamentosos, agrupados em 66 morfotipos e preservados em água destilada estéril. Foram também preparados extratos brutos a partir de micélios fúngicos utilizando-se etanol como solvente. O ensaio antimicrobiano foi realizado por meio da técnica de disco-difusão, utilizando-se os seguintes microrganismos-alvos: *Escherichia coli* ATCC 11775, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *Candida albicans* ATCC 60193 e *C. krusei* ATCC 6258. Verificou-se que 5% dos extratos foram ativos contra *E. coli*, 17% contra *S. aureus* e *C. albicans* e a maior atividade foi observada para *C. krusei*, contra o qual 42% dos extratos foram ativos. Os dados obtidos indicam que fungos endofíticos associados a *C. brasiliense* são uma fonte potencial de substâncias com atividade antimicrobiana, podendo ser utilizados em programas de triagem para busca de novos produtos naturais bioativos. Este trabalho contribui para o conhecimento da riqueza do potencial biotecnológico da micota endofítica presentes em ecossistemas brasileiros.

**Palavras-chave:** Fungos endofíticos, *Caryocar brasiliense* Camb., cerrado, atividade antimicrobiana.

**Apoio financeiro:** CEFET-MG e FAPEMIG



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 120**

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE MICROALGAS A PARTIR DE LAGOAS DO ESTADO DE MINAS GERAIS**

Hikichi, S. E<sup>1</sup>; Bonett, J. E. A<sup>1</sup>; Coelho, F. F.<sup>1</sup>; Duarte, W. F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia, UFLA, Lavras, MG, Brasil. E-mail: [suzanahikichi@gmail.com](mailto:suzanahikichi@gmail.com)

As microalgas representam um diverso grupo de microrganismos com potencial biotecnológico para obtenção de produtos de valor agregado. O crescente interesse na aplicação das microalgas na geração de bioproductos tem motivado a busca por novas espécies nativas de microalgas. Espera-se que as estirpes de algas isoladas de habitats locais sejam as mais adaptadas ao clima tropical característico brasileiro, caracterizado pela abundância de disponibilidade de luz solar, requerida para o metabolismo fotoautotrófico dessas microalgas. Portanto, cepas isoladas na região seriam promissores candidatos para a produção em larga escala. O presente trabalho teve como objetivo isolar espécies nativas de microalgas de uma lagoa localizada no município de Bom Sucesso, Minas Gerais, Brasil. O isolamento das microalgas foi realizado utilizando-se os meios de cultura BG11 modificado e Bold Basal Medium. Os cultivos foram executados em estufa BOD com fotoperíodo de 12 horas e temperaturas de 27°C durante o período claro e 23°C durante o período escuro. Métodos padrões de plaqueamento foram realizados para isolar as populações de microalgas. As amostras foram primeiramente crescidas em meio líquido visando o aumento da biomassa das microalgas. Colônias isoladas foram repetidamente estriadas em placas de Petri contendo o meio em que foram isoladas acrescido de Ampicilina 70 mg/L até que o isolamento em culturas axênicas fosse obtido. Todos os isolados foram categorizados à nível de gênero com base no aspecto morfológico das culturas e no aspecto microscópico das colônias isoladas. Os isolados incluíram microalgas verdes comuns de espécies dos gêneros *Chlorella* e *Navicula*. Trabalhos futuros envolvem identificação a nível molecular das cepas de microalgas isoladas.

**Palavras-chave:** isolamento, biomassa de microalgas, caracterização microscópica.

**Apoio Financeiro:** CAPES, FAPEMIG



## RESUMOS

Número: 121

### AVALIAÇÃO DAS NECESSIDADES NUTRICIONAIS DE *Malassezia* spp. PARA DESENVOLVIMENTO DE MODELO DE INFECÇÃO EM *Caenorhabditis elegans*

SILVA, A.P.R.<sup>1</sup>; RICOY, A.C.S<sup>1</sup>; VIANA, R.O<sup>1</sup>; ALVES, V.S<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia Celular de Microrganismo, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Email: [ana\\_rabelosilva@hotmail.com](mailto:ana_rabelosilva@hotmail.com)

O gênero *Malassezia* contém 14 espécies de leveduras lipofílicas e/ou lipodependentes, exceto *M. pachydermatis*, presentes na microbiota normal da epiderme humana, em regiões com alta concentração de glândulas sebáceas. Caracterizam-se pela incapacidade de fermentar açúcares, usando lipídios como fonte energética. O crescimento das espécies *in vitro* utiliza meios de cultura suplementados com lipídeos, sendo o meio ágar Dixon preferencial. Os modelos *in vitro* adequados para estudo das infecções por *Malassezia* spp. são reduzidos. O presente trabalho objetiva um meio de cultivo alternativo para o crescimento de *Malassezia* spp. baseado nos componentes do ágar Dixon para o crescimento moderado das leveduras em ensaios de infecção utilizando *C. elegans*, considerando a toxicidade do meio Dixon para o nematódeo e o crescimento abundante em meio NGM (Nematode Growth Medium) de *Malassezia* spp., impossibilitando análises de sobrevida nas condições propostas na literatura. O crescimento das leveduras foi avaliado para Tween 40, glicerina e oxbile em separado, em concentrações crescentes referentes ao ágar Dixon, sendo o tampão fisiológico de *C. elegans* M9 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  20mM;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  42mM; NaCl 86mM;  $\text{MgSO}_4$  1mM) a base. Amostras clínicas de *Malassezia* spp, previamente identificadas foram cultivadas nos meios alternativos por 10 dias, em diferentes condições, observando crescimento reduzido das leveduras no meio alternativo comparado ao meio Dixon. Amostras cultivadas no meio alternativo tampão M9 sólido permanecem viáveis e com a morfologia típica da espécie em meio ágar Dixon. Diferente da literatura, os dados deste trabalho demonstram a capacidade de crescimento do gênero *Malassezia* em meios de cultivo sem suplementação lipídica. Desta forma, o meio de cultivo alternativo M9 ágar permitirá a aplicação do modelo invertebrado *C. elegans* para estudos de infecção do gênero *Malassezia* spp. Análises de virulência das leveduras cultivadas em M9 ágar estão em andamento.

**Palavras Chave:** *Malassezia* spp, modelo de infecção, *C. elegans*, meio de cultivo alternativo.

**Apoio Financeiro:** CAPES, CNPq, FAPEMIG.



## **RESUMOS**

**Número: 122**

### **PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS COMO MECANISMO DE BIOSSOLUBILIZAÇÃO DE ROCHAS SILICÁTICAS POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DE SOLOS FERRUGINOSOS**

Ramos, T.C.D.A.<sup>1</sup>; Oliveira, J.C.M.D.<sup>2</sup>; Souza, F.A.<sup>3</sup>; Oliveira, C.A.<sup>3</sup>; Marriel, I.E.<sup>1,3</sup>.

<sup>1</sup>UFSJ, Sete Lagoas, MG. <sup>2</sup>Laboratório de Micologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. <sup>3</sup>Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo, EMBRAPA MILHO E SORGO, Sete Lagoas, MG, Brazil. E-mail: [joaoocmdo@yahoo.com.br](mailto:joaoocmdo@yahoo.com.br)

A comunidade de fungos filamentosos de ambientes inóspitos como solos próximos de áreas de mineração, desenvolve mecanismos adaptativos que envolvem a produção de vários metabólitos de interesse biotecnológico. O uso agrícola de rochas silicáticas como fonte alternativa de nutrientes e de condicionadores de solo torna-se relevante para a sustentabilidade da agricultura brasileira. O objetivo deste estudo foi avaliar a produção de ácidos orgânicos como mecanismo de biossolubilização de rochas silicáticas *in vitro* por fungos filamentosos isolados de áreas impactadas por mineração. Foram avaliados 9 isolados de fungos obtidos de amostras de solo da região do Quadrilátero Ferrífero, MG quanto à produção de ácido lático, oxálico, cítrico e liberação de potássio (K) a partir de 2 rochas silicáticas (verdete e flogopito) em meio de cultura líquido. Cada isolado foi inoculado em meio Ágar Batata Dextrose (BDA), por 7 dias e, em seguida, 5 discos de micélio de 8 mm de diâmetro de cada isolado foram inoculados em 50 mL de meio líquido (MISK) suplementado com pó de rocha como única fonte de potássio, e incubados por 14 dias à 28º C, sob agitação de 100 rpm. Após centrifugadas e filtradas as culturas, uma alíquota do sobrenadante foi utilizada para a quantificação dos ácidos orgânicos via HPLC (High Performance Liquid Chromatographic) e dos teores de K por meio de espectrofotometria de Emissão Atômica por Plasma (ICP). A produção de ácidos orgânicos variou em função do tipo de rocha e do isolado fúngico. Independentemente do tipo de rocha, os valores médios variaram de 13 mg.L<sup>-1</sup> a 1.400 mg.L<sup>-1</sup> para ácido cítrico, 68 mg.L<sup>-1</sup> a 329.049 mg.L<sup>-1</sup> para ácido lático e 0,54 mg.L<sup>-1</sup> a 9,5 mg.L<sup>-1</sup> para ácido oxálico, sendo que os valores mais elevados foram observados para o isolado CMSV 798, identificado como *Penicillium sp.* Os resultados observados demonstram o potencial de prospecção de fungos filamentosos para processos biotecnológicos diversos de interesse agroindustrial e ambiental.

**Palavras-chave:** bioprocessos, solubilização, potássio, *Penicillium*.

**Apoio financeiro:** Embrapa Milho e Sorgo, Capes, CNPq, Fapemig.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 123**

**PROSPECÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PRODUTORES DE CELULASES**

<sup>1</sup>Silva, C. H. C., <sup>1</sup>Oliveira, T. M. F. S. de, <sup>2</sup>Almeida, A. C., <sup>2</sup>Benassi, V. M.

<sup>1</sup>Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri-UFVJM *campus* Diamantina, Diamantina, Minas Gerais, Brasil; <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri-UFVJM *campus* Diamantina, Minas Gerais, Brasil.

O uso de enzimas fúngicas em processos industriais aparece como alternativa às tecnologias não renováveis, devido ao fato de causarem menor impacto ambiental e possuírem aproveitamento satisfatório. Os fungos filamentosos, secretores de enzimas, podem ser encontrados nos mais variados tipos de ambiente e cultivados de diversas formas, abrindo espaço para um amplo estudo de bioprospecção. Deste modo, trata-se de uma área com grande potencial de aplicação, visto que ainda há diversos campos a serem descobertos e estudados. Neste enfoque, o objetivo deste trabalho foi isolar, identificar e caracterizar microscopicamente fungos filamentosos possíveis produtores de enzimas celulolíticas. Doze fungos filamentosos foram isolados em meio de cultura sólido Aveia 2% (m/v) e Ágar 4% (m/v), à partir de quatro amostras de matéria-órgânica coletadas no lixão da UFVJM *campus* Diamantina, MG. As amostras coletadas foram fragmento plástico levemente oxidado, folha seca retirada do solo, folha em estado avançado de decomposição e fragmento de calça jeans, classificadas como C1, C2, C3 e C4, respectivamente. Para possível identificação à nível de gênero foram montadas câmaras de microcultivo com Ágar Sabouraud como meio de cultura sólido, e as colônias foram observadas no microscópio óptico com aumento de 400 vezes, à partir dos resultados foi possível a observação das estruturas reprodutivas de oito fungos, sendo esses, provavelmente, dos gêneros *Aspergillus* e *Rhizopus*.

**Palavras-chave:** Biotecnologia, Isolados, Enzimas, Microcultivo.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 124**

### **CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE *Aspergillus fumigatus***

Souza, J.A.M.<sup>1</sup>; Baltazar, L.M.<sup>2</sup>; Carregal, V.M.<sup>3</sup>; Guedes, M.I.M.C.<sup>4</sup>; Frézard, F.J.G.<sup>3</sup>; Souza, D.G.<sup>2</sup>; Teixeira, M.M.<sup>5</sup>; Soriani, F.M<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Genética Funcional, Departamento de Biologia Geral. <sup>2</sup>Laboratório de Interação Microrganismo-Hospedeiro, Departamento de Microbiologia. <sup>3</sup>Laboratório de Biofísica e Sistemas Nanoestruturados, Departamento de Fisiologia e Biofísica. <sup>5</sup>Laboratório de Imunologia e Farmacologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas. <sup>4</sup>Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. E-mail: [jessicaamanda.biomed@gmail.com](mailto:jessicaamanda.biomed@gmail.com).

A liberação de biomoléculas pelas células de diferentes organismos tem sido associada à secreção de vesículas extracelulares (VEs), um mecanismo evolutivamente conservado e considerado um potente veículo de comunicação intercelular. Estudos recentes demonstraram que a liberação de VEs por vários microrganismos, incluindo fungos patogênicos, está associada a fisiologia e patogenicidade destes microrganismos. Neste trabalho, nós isolamos pela primeira vez VEs produzidas por *Aspergillus fumigatus* (Afu), um organismo ubíquo e saprofítico e considerado um importante agente patogênico em imunocomprometidos. As primeiras caracterizações estruturais das VEs de Afu demonstraram uma produção de VEs que variam de 100 a 150 nm de diâmetro em diferentes tempos de crescimento, podendo atingir até 595 nm. Além disso, identificamos que na fase de intensa atividade metabólica de crescimento, o fungo produz cerca de  $8 \times 10^9$  VEs/mL. Nossas primeiras caracterizações funcionais das VEs de Afu demonstraram que, a sensibilização de macrófagos com VEs, antes do desafio com conídios de Afu, resultou em um aumento da capacidade fagocítica culminando em uma maior depuração do patógeno fúngico. Nós também demonstramos que as VEs de Afu são capazes de induzir a produção de TNF- $\alpha$  e CCL2 pelos macrófagos e células que foram previamente estimuladas com as VEs, quando desafiadas com o fungo, tiveram um efeito aditivo na produção de TNF- $\alpha$  e CCL2. Em conjunto, até o momento, podemos concluir que VEs são liberadas por Afu e sua produção é afetada por diferentes tempos de cultivo. Mais ainda, VEs são biologicamente ativas na sensibilização de células da resposta imune, como os macrófagos. A morfologia e o papel imunomodulador das VEs de Afu ainda não estão totalmente elucidados, portanto, como perspectivas, caracterizações estruturais adicionais, análises do conteúdo vesicular e dos principais mecanismos envolvidos no aumento da capacidade das células em combater o fungo serão investigados.

**Palavras-chave:** Vesículas extracelulares, fungos filamentosos, *Aspergillus fumigatus*.

**Apoio Financeiro:** FAPEMIG



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 125**

### **MVA RECOMBINANTE EXPRESSANDO PROTEÍNA RECOMBINANTE MULTIEPITOPO DOS HERPESVÍRUS BOVINOS 1 E 5 INDUZ RESPOSTA HUMORAL ESPECÍFICA EM MODELO CUNICULAR**

Barbosa, A.A.S.<sup>1,2\*</sup>; Leocádio, V.A.<sup>1</sup>; Laguardia-Nascimento, M.<sup>2</sup>; Ferrari, A.B.<sup>1</sup>; Da Fonseca, F.G.<sup>1</sup>; Barbosa-Stancioli, E.F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Virologia Básica e Aplicada, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. <sup>2</sup> Laboratório de Diagnóstico de Doenças Virais, Lanagro/MG, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brasil. E-mail: alinesb.bio@gmail.com

Os herpesvírus bovinos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5) causam perdas econômicas significativas na pecuária, estando associados a doenças respiratórias, reprodutivas e neurológicas no gado. O BoHV-1 está distribuído em todo o mundo, enquanto o BoHV-5 está mais associado ao hemisfério sul. Vacinas têm sido utilizadas na tentativa de controle dessas infecções, sendo a maioria delas baseada apenas no BoHV-1. A proteção cruzada entre BoHV-1 e 5 pode ocorrer, no entanto nem sempre este é o caso, e os animais podem estar infectados com ambos os vírus. O *Vaccinia virus Ankara* modificado (MVA) tem sido amplamente utilizado como vetor para a produção de vacinas devido ao seu perfil de segurança e sua capacidade de induzir respostas imunes duradouras e protetoras (humoral e celular). O coelho é um modelo animal útil e bem estabelecido para estudar a patogênese de BoHV-1 e 5 e a eficácia de vacinas contra esses vírus. O objetivo deste trabalho foi a obtenção, caracterização molecular e avaliação da imunogenicidade de uma vacina recombinante baseada no MVA expressando uma proteína recombinante multiepitópico de BoHV-1 e 5 (RecBoHV). Após construção, seleção dos clones e amplificação do MVA-RecBoHV, a presença do gene foi confirmada por PCR e por sequenciamento. Seis coelhos Nova Zelândia foram imunizados por via intramuscular com  $1 \times 10^7$  PFU de MVA-RecBoHV em protocolo dose-reforço. Após o reforço, todos os animais foram capazes de reconhecer as proteínas virais de BoHV-1 e 5 em ELISA indireto. Duas doses de MVA-RecBoHV administradas sem qualquer adjuvante foram eficazes na indução de resposta humoral específica, evidenciada pela presença de anticorpos IgG anti-BoHV-1 e 5, sugerindo que o MVA recombinante pode ser utilizado como potencial vacina contra os herpesvírus bovinos. No futuro, um ensaio seguido de desafio será realizado administrando o MVA-RecBoHV em modelo cunicular para avaliar a proteção conferida por essa vacina experimental.

**Palavras Chave:** coelho, herpesvírus bovino, MVA, proteína recombinante, vacina.

**Apoio Financeiro:** CNPq, CAPES e FAPEMIG.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 126**

### **VERIFICAÇÃO DE DESEMPENHO E COMPARAÇÃO DE DOIS KITS DE ELISA COMERCIAL PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA DOENÇA DE AUJESZKY**

Barbosa, A.A.S.<sup>1,2</sup>; Gonçalves, V.L.S.<sup>1,3</sup>; Camargos, M.F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Diagnóstico de Doenças Virais, LANAGRO/MG, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brasil. <sup>2</sup>Laboratório de Virologia Básica e Aplicada, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. <sup>3</sup> Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. E-mail: aline.barbosa@agricultura.gov.br

O *Suid alphaherpesvirus 1* (VDA) é o agente causador da doença de Aujeszky, uma doença de notificação obrigatória que causa perdas econômicas substanciais para a indústria suína. Apenas os porcos sobrevivem após a infecção e servem de reservatório para o vírus. A doença pode ser diagnosticada pela detecção do agente ou pela resposta sorológica. Testes sorológicos são indicados para determinação da infecção subclínica e dos animais em latência, especialmente na determinação do estado de saúde dos rebanhos para o tráfego internacional. Para a credibilidade dos métodos utilizados nos laboratórios de diagnóstico, é necessário realizar a verificação do desempenho dos testes e fornecer evidências de que os requisitos foram cumpridos. Este estudo teve como objetivo verificar e comparar dois kits de ELISA: o kit A detecta a presença de anticorpos anti-gB e o kit B detecta anticorpos anti-gE presentes nos soros. Foram utilizadas 20 amostras de soros negativos para VDA, 11 amostras positivas e três controles internos (negativo, fraco positivo e positivo). O processo de verificação foi composto por teste de seletividade, repetibilidade e reproduzibilidade, incerteza de medição e sensibilidade analítica. No teste de seletividade, todas as amostras apresentaram resultados negativos, apresentando 100% de especificidade em ambos os kits. Ao comparar o coeficiente de variação da repetibilidade e reproduzibilidade, observou-se que, para o kit B, os valores eram relativamente maiores para os controles positivo e fraco positivo. O kit B apresentou menores valores de incerteza em todas as etapas e sensibilidade analítica ligeiramente inferior, uma vez que o kit A detectou anticorpos em diluições duas vezes maiores. Somente o kit A foi utilizado em um teste de proficiência e obteve resultados satisfatórios. Ambos os kits apresentaram resultados satisfatórios em todas as etapas deste estudo de validação e são adequados ao uso pretendido, já que atendem a todos os critérios estabelecidos.

**Palavras Chave:** Aujeszky, diagnóstico, ELISA, verificação.

**Apoio Financeiro:** MAPA.



## **RESUMOS**

**Número: 127**

### **BIOSSENSOR BASEADO EM NANOBASTÔES DE OURO FUNCIONALIZADOS COM ANTÍGENOS DO *Dengue Virus* É CAPAZ DE DETECTAR ANTICORPOS ANTI-DENGUE DE FORMA ESPECÍFICA E EM BAIXAS CONCENTRAÇÕES**

Laura J. Cox<sup>1</sup>; Alice F. Versiani<sup>1</sup>; Luiz O. Ladeira<sup>2</sup>; Flávio G. Da Fonseca<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Virologia Básica e Aplicada, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. <sup>2</sup>Laboratório de Nanomateriais, Departamento de Física, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais. E-mail: [laura.cox@outlook.com](mailto:laura.cox@outlook.com)

A dengue é uma das doenças infecciosas mais importantes no Brasil em termos de impacto epidemiológico, sendo o diagnóstico precoce um fator determinante para a evolução da doença, especialmente naqueles pacientes acometidos pelas formas mais graves da infecção. Neste cenário, o desenvolvimento de um teste diagnóstico rápido e preciso é considerado de extrema prioridade. A nanotecnologia é um campo de pesquisa interdisciplinar que tem sido consistentemente utilizada para o desenvolvimento de sensores biológicos sensíveis e específicos. Os nanobastões de ouro (GNR) são de particular interesse especialmente por suas propriedades ópticas, como a Ressonância de Plasmon de Superfície Localizada. Assim, o objetivo deste trabalho é desenvolver um sensor que permita a detecção rápida de anticorpos anti-Dengue específicos através da variação plasmônica dos GNRs funcionalizados. Para isso, GNRs foram funcionalizados com proteínas do envelope dos quatro sorotipos virais e confirmados por espectroscopia UV-visível (UV-VIS), potencial zeta, e por microscopias eletrônica de transmissão e de força atômica. Os testes de sensibilidade do sensor foram realizados com anticorpos monoclonais comerciais e soros humanos positivos e negativos. A interação GNR-proteínas foi realizada com sucesso. Para todos os sorotipos o limite de detecção foi na concentração de fM. Os sensores se mostraram sensíveis a soros DENV positivos, não reconheceram soros negativos ou soros positivos para outros flavivírus, como ZIKV. Os GNR funcionalizados também foram testados em plataforma de ELISA, confirmando que a ferramenta confere maior sensibilidade em comparação ao teste sorológico realizado apenas com as proteínas virais puras. Este biosensor provou ser um método alternativo e rápido para o screening de pacientes positivos, mostrando alta sensibilidade. Novos testes são necessários para determinar a especificidade da plataforma diagnóstica e adaptar a escala para possível comercialização.

**Apoio financeiro:** CAPES, CNPq



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 128**

### **DESENVOLVIMENTO DE NANOPLAFORMAS DIAGNÓSTICAS SOROLÓGICAS BASEADAS EM PEPTIDEOS PARA A IDENTIFICAÇÃO DIFERENCIAL DE INFECÇÕES PELOS VIRUS DENGUE E ZIKA**

Alice Freitas Versiani<sup>1,2</sup>, Cristina Rodríguez-Quijada<sup>4</sup>, Megan Hiley<sup>2</sup>, Ann Fiegen Durbin<sup>2</sup>, Helena De Puig<sup>2</sup>, Irene Bosch<sup>2</sup>, Kimberly Hamad-Schifferli<sup>3,4</sup>, Lee Gehrke<sup>2,5</sup>, Flávio Guimarães Da Fonseca<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UFMG - Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, <sup>2</sup>IMES MIT - Institute of Medical Engineering and Science, Massachusetts Institute of Technology, <sup>3</sup>MechE MIT - Department of Mechanical Engineering, Massachusetts Institute of Technology, <sup>4</sup>UMass - Department of Engineering, University of Massachusetts Boston, USA, <sup>5</sup>HMS - Department of Microbiology and Immunobiology, Harvard Medical School. Email: afversiani@gmail.com

Infecções causadas pelo *Dengue virus* (DV) estão entre as mais importantes doenças humanas transmitidas por artrópodes no mundo, sendo o diagnóstico precoce um fator imprescindível para o bom prognóstico das infecções. A co-circulação de outros vírus, como o *Zika virus* (ZV), que apresenta elevada reatividade cruzada com DV, adiciona mais um fator complicador neste diagnóstico. A identificação de peptídeos específicos para cada vírus é uma forma de evitar a ocorrência de cross-reactividade, entretanto, a imobilização dos mesmos em superfícies é uma barreira para sua utilização em plataformas diagnósticas de rotina. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi selecionar peptídeos da proteína não-estrutural 1 (NS1) de ambos os vírus, imobilizar estavelmente à superfície de nanopartículas de ouro (GNS) e utilizar para imunoensaios sorológicos de cromatografia lateral para IgG, IgM e IgA. Para tanto, foi realizado um *screening* em janela deslizante de epítópos das proteínas NS1 utilizando anticorpos monoclonais específicos. Foram selecionados um peptídeo que identifica apenas DV, um que identifica apenas ZV e um conservado entre os vírus. Cada peptídeo foi tiolado e funcionalizado às GNS, sendo a ferramenta caracterizada por UV-VIS, potencial zeta e DLS. Paralelamente, peptídeos biotinilados foram ancorados à streptavidina para imobilização em membrana. Ambas as estratégias de imobilização foram eficientes, e os testes com anticorpos monoclonais comprovaram a não existência de reatividade cruzada, sendo o limite de detecção da técnica para até 10ng/mL de anticorpo. As *strips* também foram testadas com soros de pacientes humanos. Os cassete foram adaptados para uma plataforma de captação de imagem digital, por intermédio de aplicativo para celular, tornando esta plataforma em *point-of-care*. Um algorítmico foi desenvolvido para a quantificação das amostras de acordo com a intensidade da linha teste. Novos experimentos são necessários para a validação do teste com soros humanos.

**Apoio financeiro:** CAPES, CNPq, NIH AI100190.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 129**

**PRODUÇÃO DA PROTEÍNA DO ENVELPE (E) DO ZIKA VÍRUS PARA O  
DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DIAGNÓSTICOS**

**BAGNO, F. F.\*; SERUFO, A. V\*; LEOCÁDIO, V. A. T.\*; VERSIANI, A. F. \*; DA FONSECA, F. G. \***

\* Laboratório de Virologia Básica e Aplicada, Depto de Microbiologia, ICB/UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. E-mail: [flavia.bagno@gmail.com](mailto:flavia.bagno@gmail.com)

O Zika vírus (ZIKV), um arbovírus da família *Flaviviridae*, se tornou uma preocupação mundial para os órgãos de saúde pública devido à sua rápida dispersão e a possibilidade de alguns casos graves, como complicações congênitas e síndrome de Guillain-Barré. As semelhanças clínicas entre outras arboviroses co-circulantes no Brasil, como Dengue e Chikungunya, reforçam a necessidade de se investir em testes diagnósticos. Um teste sorológico apresenta a vantagem de detecção da doença em fase aguda, bem como para a possibilidade de monitoramento e estudos epidemiológicos. A proteína do envelope de ZIKV (ZIKV-E) demonstrou ser imunodominante e associada à geração de anticorpos. O objetivo deste trabalho foi desenhar um gene sintético que codifica a proteína do envelope do vírus ZIKA (sZIKV-E), para ser utilizada em ensaios de diagnóstico. Inicialmente, os genes que codificam a proteína E de 148 seqüências de ZIKV, depositadas no *GenBank*, foram alinhados para gerar uma seqüência de consenso. Métodos computacionais foram utilizados para prever estrutura e propriedades físico-químicas da sZIKV-E. O potencial antigênico predito pelo software VAXIJEN\_v2.0 foi de 0,58 (provável antígeno). O domínio transmembrana da proteína foi removido e sua sequência nucleotídica foi otimizada e克lonada em pET21a. Bactérias BL21 transformadas foram induzidas com IPTG, seguindo-se de análise por SDS-PAGE. Constatou-se melhor condição de expressão após a indução por IPTG a 1 mM durante 3 h. Após produção em larga escala e subsequente lise celular, o extrato protéico foi purificado por cromatografia de afinidade e a antigenicidade da proteína foi verificada por *western blot*, sendo positiva tanto para anticorpos monoclonais anti-histidina quanto contra o soro de camundongos infectados por ZIKV. Em SDS-PAGE, sZIKV-E apresenta massa molecular prevista (~50 kDa). Perspectivas futuras incluem a utilização da proteína produzida para o desenvolvimento de testes diagnósticos sorológicos.

**Palavras chave:** Zika vírus, proteína E, expressão heteróloga, diagnóstico sorológico.

**Apoio financeiro:** CNPQ e CAPES



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 130**

### **DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE RÁPIDO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA**

**FRANCO-LUIZ, A.P.M<sup>1,2,3</sup>; RIBEIRO TEIXEIRA, K.P.R. <sup>3</sup>; CARVALHO, I.V. <sup>4</sup>; FREITAS, L.S. <sup>4</sup>;**  
**FERREIRA, P.C.P. <sup>1</sup>; KROON, E.G. <sup>1</sup>;**

<sup>1</sup>Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas- Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte/MG.

<sup>2</sup>Universidade FUMEC, Belo Horizonte, Minas Gerais

<sup>3</sup>Viriontech do Brasil Industria de Insumos e Serviços em Biotecnologia Ltda , Belo Horizonte, Minas Gerais

<sup>4</sup>Quibasa Química Básica Ltda.

A anemia infecciosa eqüina (AIE) acomete animais da família *Equidea*, incluindo equinos, muares e asininos. A doença é transmitida por insetos hematófagos e o agente causador da doença é um vírus da família *Retroviridae*. A doença se desenvolve em três estágios: agudo, crônico e assintomático, sendo os sinais clínicos mais proeminentes a: febre recorrente, anemia hemolítica, anorexia, rápida perda de peso, e o edema ventral. A AIE compromete significativamente o desempenho dos animais afetados, ocasionando grandes perdas econômicas. Não existe tratamento ou vacina para AIE, o controle da doença é feito por sacrifício dos animais soropositivos. A imunodifusão em gel de ágar (IDGA) é o método oficial para diagnóstico da AIE na maioria dos países, inclusive no Brasil. O IDGA possui algumas limitações, assim sendo tornou-se necessário o desenvolvimento de testes mais sensíveis e rápidos para o diagnóstico. Este trabalho tem como objetivo desenvolver um teste rápido para detectar anticorpos contra a proteína recombinante gp90. A proteína recombinante expressa em bactérias *E. coli* foi purificada e usada para detecção indireta no teste rápido desenvolvido. Diferentes membranas, concentrações de anticorpos e de soluções foram avaliadas. Após estabelecer as melhores condições de reação 10 amostras foram testadas, sendo 5 amostras positivas para o IDGA que também foram positivas para o teste rápido e 5 amostras negativas para o IDGA que também foram negativas no teste rápido. O teste rápido apresentou resultado satisfatório, com a vantagem de ser um método simples, de fácil execução e de rápido resultado. O teste precisa ser produzido em maior escala a fim de testar um maior número de amostras.

**Palavra chave:** Anemia infecciosa equina, teste rápido, diagnóstico.

**Apoio Financeiro:** CNPQ



## **RESUMOS**

**Número: 131**

### **PRODUÇÃO DE ETANOL E XILITOL POR NOVAS ESPÉCIES DE LEVEDURAS DO GÊNERO *Spathaspora* ISOLADAS DA FLORESTA AMAZÔNICA BRASILEIRA**

Soares, R. C. C.<sup>1</sup>; Lopes, M. R.<sup>1</sup>; Rosa, C. A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Leveduras, Departamento de Microbiologia/ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. E-mail: rafaelamicrobiologia@gmail.com

O etanol de segunda geração é uma alternativa à utilização dos combustíveis fósseis, uma vez que emite menor quantidade de poluentes. Este pode ser obtido a partir de resíduos lignocelulósicos por meio da fermentação por micro-organismos, principalmente leveduras. A completa utilização da biomassa lignocelulósica é um dos pré-requisitos para tornar o etanol de segunda geração economicamente competitivo. A D-xilose, segundo açúcar mais abundante na biomassa, não é naturalmente fermentada por *Saccharomyces cerevisiae*, a principal levedura utilizada na indústria. Além da produção de etanol, o xilitol, um adoçante alternativo a sacarose, também pode ser produzido a partir de xilose por processos biotecnológicos. Diante disto, leveduras assimiladoras de D-xilose vêm sendo investigadas e diversos estudos têm conduzido à descrição de novas espécies fermentadoras desta pentose. Algumas das espécies mais promissoras pertencem ao gênero *Spathaspora*. O objetivo deste trabalho foi descrever e caracterizar novas espécies de *Spathaspora*. As linhagens UFMG-CM-Y425, UFMG-CM-Y6059, UFMG-CM-Y6060 e UFMG-CM-Y6078 foram isoladas de madeira em decomposição em regiões da Floresta Amazônica. A identificação das espécies foi feita por análises do gene que codifica a região ITS-5.8S e os domínios D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA. Os isolados representam quatro novas espécies pertencentes ao clado *Spathaspora*. As linhagens UFMG-CM-Y425 e UFMG-CM-Y6060 estão filogeneticamente relacionadas a *Sp. arboriae*; a linhagem UFMG-CM-Y6059 está mais próxima de *Sp. boniae*; enquanto que a espécie mais próxima da linhagem UFMG-CM-Y6078 é *Sp. roraimanensis*. Ensaios de fermentação foram realizados para caracterizar a assimilação de D-xilose e todas as novas espécies de *Spathaspora* foram capazes de consumir xilose e produzir etanol e xilitol com diferentes eficiências.

**Palavras-chave:** novas espécies de leveduras, etanol de segunda geração, xilitol, *Spathaspora*, D-xilose

**Apoio financeiro:** FAPEMIG, CAPES, CNPq



## **ÁREA: SAÚDE**

**Número: 132**

### **DEGRADAÇÃO SUPERFICIAL PROVOCADA PELO METABOLISMO DO *Streptococcus mutans* EM UM MATERIAL RESTAURADOR DENTÁRIO: ESTUDO IN VITRO.**

Almeida, M.M.; Assaf, B.R; Oliveira, U.A.C; Dos Santos, L.A; ALVES, D.R; Maximiano, V.S; Alves, L.M.S; Sette-Dias, A.C. e-mail: settedias\_ac@yahoo.com.br

Centro Universitário Newton Paiva, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

As resinas compostas tornaram-se os materiais restauradores diretos mais comumente utilizados na prática odontológica, contudo, os *Streptococcus mutans*, microrganismos constituintes do biofilme oral, podem ser capazes de alterar superficial e microestruturalmente tal material, comprometendo suas propriedades. O objetivo deste estudo *in vitro* foi avaliar as alterações de uma resina composta pelos metabolitos do *Streptococcus mutans* em um meio de cultivo com e sem sacarose. Foram confeccionados 32 corpos de prova em resina composta fotopolimerizável de acordo com a ISO 4049:2009, fotoativados por 40 segundos em cada face. Os corpos de prova foram esterilizados em óxido de etileno e em seguida, foram divididos aleatoriamente em quatro grupos ( $N=8$ ): o grupo controle externo (G1), grupo controle interno imerso em caldo BHI (G2), no grupo G3 foi inoculado o *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™ e no grupo G4 foi inserido o mesmo microrganismo associado à sacarose 5%. Após o período incubação de 28 dias as amostras foram submetidas aos testes de micro-rugosidade, micrografia e microdureza. Os resultados evidenciaram que os grupos G3 e G4 apresentaram maior rugosidade superficial e menor dureza quando comparados com os grupos controle G1 e G2. Concluiu-se que, metabólitos produzidos pelos *Streptococcus mutans* são capazes de alterar a superfície e a microestrutura do compósito e estas alterações foram exacerbadas na presença de sacarose.

**Palavras chave:** *Streptococcus mutans*, Materiais dentários, Degradação.

**Apoio Financeiro:** Centro Universitário Newton Paiva



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 133**

### **MASTITE CAUSADA POR *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus***

BRITO, R.F.<sup>1</sup>; VALENTE, G.L.C.<sup>1</sup>; de QUAY, A.A.<sup>1</sup>; DIAS, R.G.<sup>1</sup>; SILVA, T.M.L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, Escola de veterinária, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: rommelf@hotmail.com

Mastite é a inflamação da glândula mamária em resposta à infecção por microrganismos como *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Mycoplasma* spp. e coliformes. É a doença mais comum e dispendiosa em rebanhos de bovinos leiteiros, devido à redução do volume e qualidade do leite, custos com prevenção e tratamento, descarte de vacas cronicamente infectadas e mortalidade. O objetivo da revisão foi abordar as características e importância da mastite causada por *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* (SEZ). SEZ é uma bactéria com potencial zoonótico presente na microbiota do trato respiratório e urogenital de equinos, sendo o principal agente causador de mastite em éguas. Também é conhecida por causar casos esporádicos em bovinos, caprinos e ovinos. A eliminação da bactéria no leite é a principal fonte de infecção para humanos, que se contaminam pela ingestão de leite e derivados crus. A mastite causada por SEZ é chamada de pseudo-agalaxia já que produção de leite reduz nas glândulas mamárias afetadas e cessa dias após o surgimento dos sinais. Por essa característica, muitas vezes o quadro é confundido clinicamente pela agalaxia crônica contagiosa causada por *Mycoplasma* spp. Nestes casos, os animais apresentam sinais locais e sistêmicos de mastite clínica, além de elevada contagem de células somáticas ( $>10^6$  CCS/mL). Para o controle de mastite por SEZ deve-se tratar os animais infectados com antimicrobianos e considerar a segregação de diferentes espécies em uma propriedade a fim de evitar a exposição do rebanho leiteiro ao agente uma vez que este é comensal em equídeos. Também é importante adequar o procedimento de ordenha higiênica para evitar a disseminação de mastite no rebanho, assim como o surgimento de novos casos. Conclui-se que o diagnóstico correto da mastite por SEZ é importante para adoção dos procedimentos adequados para o tratamento e prevenção da doença, a fim de manter a qualidade do leite e o bem-estar animal e evitar perdas econômicas.

**Palavras chave:** Mastite, *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus*, leite.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 134**

### **EFFECTS OF INCREASED ADIPOSE TISSUE ON ALVEOLAR BONE LOSS IN MICE**

Ian de Meira Chaves<sup>1</sup>, Marina Campos Zicker<sup>2</sup>, Alice de Oliveira Laranjeira<sup>1</sup>, Poliana Mendes Duarte<sup>4</sup>, Mauro Martins Teixeira<sup>5</sup>, Daniele da Glória de Souza<sup>1</sup>, Tarcília Aparecida da Silva<sup>3</sup>, Adaliene de Matos Versiani<sup>6</sup>, Mila Fernandes Moreira Madeira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia - Instituto de Ciências Biológicas (ICB); <sup>2</sup>Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia; <sup>3</sup>Departamento de Cirurgia, Clínica e Patologia Odontológicas, Faculdade de Odontologia - UFMG; <sup>4</sup>Universidade Guarulhos; <sup>5</sup>Departamento de Bioquímica e Imunologia - ICB;

<sup>6</sup>Departamento de Nutrição - Escola de Enfermagem - UFMG. Email do apresentador: iandemeirachaves@hotmail.com

Periodontal disease (PD) is an inflammatory disease of infectious origin affecting the tooth supporting structures. Changes in host oral microbiota favor colonization by periodontal bacteria, triggering an exaggerated inflammatory response that can lead to the destruction of periodontal tissues. The increase of the adipose tissue can contribute to the activation of inflammatory response with possible impact on periodontal health. This study aimed to evaluate the effect of increased adipose tissue in alveolar bone conditions in mice. Groups of mice were maintained on standard or HF diet for 12 weeks. After, euthanasia was performed and the following parameters were determined: adiposity index, alveolar bone loss, neutrophils influx, production of cytokines (ELISA), bone phenotype (microCT) in maxilla and bacterial load (qPCR) on periodontal tissues. Hereafter, groups of mice on standard or HF diet were topically treated with chlorhexidine (CHX) and the same parameters were evaluated. We also evaluate cytokines and alveolar loss bone in leptin receptor deficient ( $db/db^{-/-}$ ) mice. HF diet was associated with increased adiposity, spontaneous alveolar bone loss, decreased of bone mineral density (BMD) when compared to standard diet. Additionally, mice fed with HF diet presented decreased IL-10 levels in periodontal tissues and significantly less adiponectin in serum. Moreover, HF diet induced increased neutrophil influx in periodontal tissues and was also associated with disbiose in oral biofilm. Depletion of oral microbiota by CHX was able to reverse the phenotype of alveolar bone loss and changes in BMD associated with HF diet. The  $db/db^{-/-}$  mice, which are an animal model of obesity, also presented alveolar bone loss when compared to WT mice. These results indicate that increased adiposity may contribute to the production of inflammatory mediators, which in turn may be related to changes in oral biofilm and, this way, may contribute to alveolar bone loss.

**Uniterms:** Periodontal disease. High fat diet. Mice. Oral microbiota.

**Supported by:** CAPES, FAPEMIG, CNPq.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 135**

**CARACTERIZAÇÃO DE INFECÇÕES POR ACINETOBACTER BAUMANNII EM UM HOSPITAL EM BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS.**

Mariana Leles Nunes Gripp<sup>1</sup>; Danielle Amaral<sup>1</sup>; Shaiene Dandara Ferreira Alves<sup>1</sup>; Ana Paula Moreira Franco-Luiz<sup>1</sup>;

<sup>1</sup>Universidade Fumec

O *Acinetobacter baumannii* é um cocobacilo gram-negativo não fermentador aeróbio, pode apresentar cápsula, fímbria e formação de biofilmes. É comum no ambiente, vivendo como saprófitas, no solo, rios, lagos. Em indivíduos saudáveis pode ser encontrado na microbiota da pele e garganta, entretanto, em casos de baixa imunidade podem causar infecções sendo classificado oportunista. Em infecções hospitalares, a *Acinetobacter baumannii* tem sido constantemente isolados e em algumas situações apresentam multi resistência às terapias disponíveis, o que o torna tão perigoso em um ambiente como as Unidades de Internação (UI) e os Centros de Tratamento Intensivo (CTI). Este trabalho tem como objetivo avaliar as características dos indivíduos infectados, as principais amostras biológicas infectadas e se há diferença de infecção comparando dois locais do hospital. Foram analisadas amostras de aspirados traqueal e broncopulmonar, swab de ferida, secreção e ponta de cateter de pacientes de um hospital em Belo Horizonte - MG em UI e CTI, no período de Janeiro de 2016 a Agosto de 2016. Dos 44 casos de infecção por *A. baumannii*, 29 (66%) eram do sexo masculino e 15 (34%) do sexo feminino. A maioria das infecções (82%) ocorreu em pacientes com mais de 65 anos. A taxa de isolamento foi obtida nos aspirados traqueais 61,7% (29 casos), ponta de cateter 19,2%, swab 14,9%, aspirado broncopulmonar 2,1% e secreção 2,1%. Comparando o ambiente hospitalar, 31 casos (70%) ocorreram no CTI, e 13 (30%) nas UI. A relação do patógeno nos aspirados traqueais mostra a relação da instalação do mesmo em infecções de trato respiratório devido à relação intrínseca do mesmo com a água e ambientes úmidos. O trabalho demonstra que pacientes imunocomprometidos possuem maior chance de infecção com microrganismos oportunistas. Portanto, é importante a total adesão dos profissionais de saúde às precauções empregadas, visando evitar a disseminação da *A. baumannii* no ambiente hospitalar.

**Palavra chave:** *Acinetobacter baumannii*, hospital, paciente



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 136**

### **EFEITO DE SOLUÇÕES DESINFETANTES DE PRÓPOLIS VERDE BRASILEIRA NA REMOÇÃO DO BIOFILME BACTERIANO NA SUPERFÍCIE DE ELASTÔMERO MAXILOFACIAL**

Lopes, I.B.S.<sup>1,3</sup>; Farias, L.M.<sup>1</sup>; Magalhães, P.P.<sup>1</sup>; Santos, S.G.<sup>1</sup>; Calefi, D.G.<sup>1</sup>; Mesquita, R.A.<sup>2</sup>; Moreno, A<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, MG. <sup>2</sup>Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas, Faculdade de Odontologia, Belo Horizonte, MG. <sup>3</sup>Laboratório de Prótese Bucomaxilofacial, Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas, Faculdade de Odontologia, Belo Horizonte, MG. E-mail: isabelabslopes@yahoo.com

As próteses faciais visam reconstruir artificialmente as perdas de substâncias das diversas regiões da face por meio do silicone protético facial. No entanto, este material pode se tornar excelente meio para microrganismos oportunistas. O objetivo deste estudo foi testar a eficácia de soluções a base de extrato de própolis verde comparativamente a soluções convencionais na remoção do biofilme em discos de elastômero de silicone facial. Foram confeccionados discos de silicone de 10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura e submetidos a 48 horas de crescimento e desenvolvimento do biofilme de *Staphylococcus aureus*. Os discos de silicone foram tratados com as soluções propostas no estudo (solução aquosa de própolis verde-SAPV e/ou etanólica de própolis vede-SEPV, ambas na concentração de 10%; agente antimicrobiano DaroBrand-ATDB, específico para prótese facial; gluconato de clorexidina a 4%-CHX4 como controle positivo; e água destilada-CTLA como controle negativo). Os tratamentos de desinfecção para todas as soluções foram realizados em 3 diferentes períodos de tempo (10 min, 15 min ou 30 min). A análise microbiológica foi realizada em triplicata em dois experimentos independentes. A contagem de colônias foi verificada por análise do número de UFC/mL Análise de Variância (ANOVA) dois-fatores foi aplicada aos dados, seguida por teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Verificou-se para os tratamentos de CHX4 e SEPV ausência de UFC. Ambos os tratamentos: SAPV e ATDB apresentaram menores valores de UFC em relação ao controle. Concluiu-se amplo espectro antibiofilme para SEPV, e efeito antimicrobiano eficaz aos demais tratamentos avaliados.

**Palavras-chave:** Prótese maxilofacial. Biofilme. Desinfecção. Própole. Clorexidina.

**Apoio financeiro:** PIBIC/CNPq



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 137**

### **MICOBACTERIOSE EM UM TRINCA-FERRO (*Saltator similis*)**

Medeiros, L. B.<sup>1</sup>; Marín-Gómez,S. Y.<sup>2</sup>; Moreira, M. V. L.<sup>4</sup>;Ecco, R.<sup>5</sup>;Pinto, P.N.<sup>1</sup>; Costa, C. S.<sup>3</sup>; Mureb, E. N.<sup>1</sup>; Silva, A. S. G.<sup>4</sup>;Coelho, H. L.G. <sup>3</sup>;Martins, N. R. S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Residência Integrada em Medicina Veterinária da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais; <sup>2</sup>Prof. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG;

<sup>3</sup>Graduanda da Escola de Veterinária da UFMG; <sup>4</sup>Pós-graduando em Ciência Animal da Escola de Veterinária da UFMG; <sup>5</sup>Setor de Patologia da Escola de Veterinária da UFMG.E-mail: lilianbmdeiros@gmail.com

A micobacteriose é uma doença causada por bacilos do gênero *Mycobacterium*. As espécies que infectam aves, raramente acometem seres humanos, em especial os imunodeprimidos. Relata-se a ocorrência de micobacteriose em um trinca-ferro (*Saltator similis*), encaminhado para diagnóstico *post mortem*. A ave adulta vivia em cativeiro e apresentou apatia nos últimos dias antes do óbito. Realizou-se necropsia completa e a principal alteração foi o aumento de tamanho acentuado do fígado e áreas milimétricas multifocais a coalescentes amareladas, amorfas, algumas levemente salientes que se aprofundavam no parênquima. Foi coletado parte das amostras do fígado para cultura diferencial por plaqueamento em ágar sangue, em aerobiose, e parte em formalina a 10% tamponada para exame histopatológico. Não houve crescimento bacteriano em ágar sangue. À histopatologia haviaperda do parênquima hepático e infiltrado inflamatório linfo-histiocitário, com inúmeros macrófagos epitelioides, numerosas células gigantes multinucleadas e áreas multifocais centrais de necrose. Foi realizada histoquímica, por Ziehl-Neelsen,que corou positivamente inúmeros BAAR extra e intra-citoplasmáticos em histiócitos, macrófagos epitelioides e células gigantes multinucleadas,sendo compatível com infecção por bactérias do gênero *Mycobacterium*. Em outras secções do fígado, haviam numerosos macrófagos com pigmento acastanhado no citoplasma, multifocal intenso (hemossiderose) e alguns hepatócitos continham vacúolo bem delimitado intracitoplasmático multifocal moderado (lipidose). Demonstra-se de forma preliminar a ocorrência de micobacteriose em ave, e destaca-se a necessidade da técnica de histoquímica para *Mycobacterium* no diagnóstico *post mortem* em aves. O trinca-ferro é uma das espécies mais apreendidas no comércio ilegal no Brasil. Com o aumento do número de apreensões e seus impactos negativos a saúde dos animais, recomenda-se o estudo epidemiológico de *Mycobacterium* em passeriformes silvestres em cativeiro.

**Palavras-chave:** *Mycobacterium*, passeriformes, zoonoses, silvestres.

**Apoio financeiro:** Programa de Residência Integrada em Medicina Veterinária/UFMG/MEC, CNPq, FAPEMIG, CAPES



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 138**

### **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO E FRAÇÕES DE *Sebastiania brasiliensis* Spreng. (Euphorbiaceae)**

**ALVES, V.T.<sup>1</sup>; SCOARIS, D.O.<sup>2</sup>; ALMEIDA, V.L.<sup>2</sup>, SILVA, A.F<sup>3</sup>, SILVA, C.G.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Biotecnologia e <sup>2</sup>Serviço de Bioquímica e Prospecção Farmacêutica - Fundação Ezequiel Dias - FUNED, Belo Horizonte, MG. <sup>3</sup>Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. E-mail: [valeria.alves@funed.mg.gov.br](mailto:valeria.alves@funed.mg.gov.br)

A família Euphorbiaceae possui cerca de 1000 espécies no Brasil. *Sebastiania brasiliensis*, pertencente a esta família, é conhecida popularmente como leiteiro, pau-de-leite, branquilho ou mata-berne e utilizada como medicinal. A casca do caule é utilizada no tratamento de amenorréia, leucorréia, como purgativo e diurético; topicamente é utilizada para tratar dermatites, eczemas, hidropsia e sífilis. Decocções das suas folhas e galhos são popularmente consideradas úteis como um anti-séptico para feridas. O látex é empregado na eliminação de verrugas e como analgésico em dores de dente. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico e das frações de caules e folhas de *S. brasiliensis* frente à *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. O extrato etanólico (EtOH) foi obtido por sonicação e as frações por percolação seriada com solventes de polaridades crescentes. O extrato EtOH e as frações em acetato de etila e em metanol foram avaliados quanto à atividade antibacteriana frente à *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 11775), na concentração de 500µL/mL pelo método de microdiluição em caldo, segundo as normas do NCCLS M7-A6, com adaptações. Entre as amostras avaliadas, a fração metanólica das folhas apresentou 56,5% ± 15,9 de inibição frente à *S. aureus* e 41,7% ± 2,1 frente à *E. coli*. Esta fração foi considerada a mais promissora para atividade antibacteriana frente à *S. aureus*. Estes resultados preliminares corroboram a atividade antibacteriana reportada na literatura e atribuída à presença de compostos fenólicos na espécie.

**Palavras chave:** *Sebastiania brasiliensis*, mata-berne, uso medicinal, atividade antibacteriana.

**Apoio financeiro:** FUNED.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 139**

### **IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E SIMILARIDADE CLONAL DE AMOSTRAS DE *Staphylococcus* COAGULASE NEGATIVO ISOLADAS EM RESÍDUOS CLÍNICOS E NAS FOSSAS NASAIS DE TRABALHADORES.**

Calefi, D. G.; Macedo, L. M.; Magalhães, P. P.; Vieira, C. D.; Santos, S. G.

<sup>1</sup>Laboratórios de Microbiologia Oral e Anaeróbios, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte.

Os resíduos potencialmente infectantes gerados nos serviços de saúde, incluindo os da Odontologia, representam risco para os trabalhadores e o meio ambiente. Diversos microrganismos potencialmente patogênicos podem ser recuperados nestes materiais, incluindo os *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCoN). Este grupo microbiano pode comportar-se como patógenos oportunistas em acidentes com perfurocortantes ou para pacientes imunocomprometidos. Assim, a identificação e a correlação das espécies microbianas recuperadas nos funcionários e nos resíduos clínicos, pode elucidar o risco de disseminação. O objetivo deste estudo foi identificar amostras de SCoN, no nível de espécie, e avaliar sua similaridade genética. Foram recuperadas 135 amostras de SCoN da cavidade nasal dos funcionários e de resíduos nos tempos 0 e 180 dias em uma clínica odontológica. O método fenotípico MALDI-TOF foi utilizado para identificação das espécies e o rep-PCR (GTG)<sub>5</sub> para a análise de similaridade genotípica. Os dendogramas foram gerados pelo Software Gel J. Nas duas coletas iniciais houve predomínio de *S. epidermidis* (69,1%; 78,26%), seguido de *S. warneri* (10,9%; 15,94%), respectivamente. Na primeira coleta, o terceiro grupo foi *S. pasteuri*, e *S. hominis* (5,71% cada) e na segunda, *S. haemolyticus* e *S. hominis* (1,45% cada). Nos resíduos, *S. epidermidis* também foi a espécie predominante (72,72%), seguido de *S. warneri* e *S. hominis*, 9,09% cada. Observou-se 100% de similaridade em duas amostras de *S. epidermidis* isoladas de dois funcionários diferentes, do mesmo turno de trabalho; 85% de similaridade entre duas amostras de *S. epidermidis*, recuperadas da fossa nasal de um funcionário e nos resíduos. Percebeu-se, também, amostras provenientes das duas coletas, de funcionários diferentes, com 75% de similaridade. Os achados, apesar de parciais, sugerem a contaminação dos funcionários a partir dos resíduos e fundamentam a necessidade de adoção de medidas efetivas de gerenciamento destes materiais.

**Palavras Chave:** *Staphylococcus*, Resíduos em Serviços de Saúde; Risco Ocupacional.

**Apoio Financeiro:** Fapemig; Capes; CNPq; PRpq/UFMG



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 140**

**APLICAÇÕES DO OZÔNIO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS**

DIAS, R.G.<sup>1</sup>; SILVA, T.M.L.<sup>1</sup>; BRITO, R.F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, Escola de veterinária, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: raisa-gdias@hotmail.com

A contaminação microbiológica na indústria de alimentos representa um perigo para a saúde do consumidor, uma vez que os produtos de origem animal podem veicular microrganismos associados a surtos de origem alimentar, além de ocasionar prejuízos econômicos. Métodos de conservação são utilizados em associação as boas práticas de fabricação para a obtenção de produtos com maior qualidade microbiológica. Tais métodos devem inibir o crescimento dos microrganismos indesejáveis com mínimas alterações bioquímicas, promovendo a manutenção da qualidade nutricional e sensorial dos alimentos. Foram propostos vários métodos que incluem adição de conservantes, tratamento térmico, radiação e atmosfera modificada. A utilização do ozônio ( $O_3$ ) tem sido avaliada para a conservação dos produtos de origem animal, por ser um agente antimicrobiano de elevada reatividade e decomposição espontânea a produtos não tóxicos (oxigênio), e não formar compostos carcinogênicos. Geralmente reconhecido como seguro (GRAS) pelo *Food and Drug Administration* (FDA), a ozonização tem sido utilizada na Europa para sanitizar água para o consumo humano. A forma gasosa do ozônio tem sido recomendada em câmaras frigoríficas e depósitos de alimentos para manutenção desses ambientes limpos e desinfetados. A água ozonizada tem se mostrado eficaz em sistemas de tubulação *Clean-In-Place* (CIP) em plantas de processamento de alimentos, sendo muito vantajoso ao saneamento industrial. A aplicação do ozônio na superfície de alimentos e na composição dos gases em embalagens de atmosfera modificada tem apresentado bons resultados experimentalmente. No entanto, o ozônio aplicado em altas concentrações, pode promover a rancificação oxidativa, alterando o sabor e a coloração do produto alimentício. Com tudo, a utilização do ozônio na conservação de alimentos em larga escala requer pesquisas que estabeleçam a dosagem adequada de ozônio e as condições de tratamento nos diferentes tipos de alimentos.

**Palavras chave:** Ozonização, controle de qualidade, contaminação microbiana, segurança alimentar



## **RESUMOS**

**Número: 141**

### **EFEITO ANTIMICROBIANO DO EXTRATO AQUOSO DE *Allium sativum* L. SOBRE O CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS *Staphylococcus aureus* E *Escherichia coli***

**FONSECA, C.O.<sup>1</sup>; VALLIENGO, I. A.<sup>1</sup>; CHUCRE, T. C.<sup>1</sup>; CASALI, A. K.<sup>2</sup>; AVELAR, D. M.<sup>2</sup>; MOURA, M. Z. D.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Aluno <sup>2</sup>Professor. Centro universitário UNA. Rua dos Guajajaras, 175 - Centro, Belo Horizonte, MG. E-mail: cristhianeoliveira.f@gmail.com

O *Allium sativum* L., conhecido como alho, tem sido estudado como uma planta com efeito antimicrobiano. Sua ação tem sido testada para o controle de infecções causadas por bactérias Gram-positivas como o *Staphylococcus aureus*, que pode causar infecções simples a graves. Também é testada em *Escherichia coli*, bactérias Gram-negativas, potenciais causadoras de infecções intestinais. Sendo assim, o objetivo do presente estudo é avaliar o efeito antimicrobiano do extrato aquoso de *A. sativum* sobre o crescimento das bactérias *S. aureus* e *E. coli*, em comparação com o efeito do antibiótico Cloranfenicol. Para isso, foi feito o extrato aquoso utilizando 200 g de alho fresco para 100 mL de água destilada, triturando no liquidificador por 4 minutos. Após 48 horas, foi realizado o teste de susceptibilidade: as bactérias foram diluídas em 5 mL de solução fisiológica à 0,9% e semeadas separadamente em placas de Petri com Ágar Muller-Hinton. Foram colocados três discos de papel em placa, dois virgens onde foram pipetados 20 µl de extrato aquoso de alho e outro contendo cloranfenicol 30 µg, sendo o extrato previamente filtrado com filtro millipore 0,22 µm. O extrato aquoso do *A. sativum* L. apresentou efeito inibitório no crescimento de *S. aureus* e *E. coli*, apresentando halos superiores a 12 mm. Bactéria *S. aureus*: Cloranfenicol – 25 mm; extrato aquoso de alho – 23,8 ± 0,35 mm. Bactéria *E. coli*: Cloranfenicol – 30 mm; extrato aquoso de alho – 26,0 ± 4,24 mm. Todos os halos encontrados nesse experimento eram superiores a 12 mm, confirmando assim a ação do alho como antimicrobiano para as bactérias *E. coli* e *S. aureus*. Os resultados encontrados no presente trabalho estão de acordo com trabalhos anteriores descritos na literatura.

**Palavras Chave:** Plantas medicinais, bactérias Gram-Positivas, bactérias Gram-negativas, Cloranfenicol.

**Apoio Financeiro:** Centro Universitário UNA



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 142**

**DETERMINANTES GENÉTICOS DE BACTERIOCINAS EM *Shigella***

Freitas, D. L.<sup>1</sup>, Ferreira, J. F. G.<sup>1</sup>, Sousa, M. A. B.<sup>2</sup>, Nascimento, A. M. A<sup>3</sup>, Farias, L.M.<sup>1</sup>, Magalhães, P.P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG; <sup>2</sup>Hermes Pardini, Belo Horizonte, MG; <sup>3</sup>Laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG

A diarreia infecciosa aguda é uma doença que acomete indivíduos de todas as idades e classes sociais, sendo estimada a ocorrência de aproximadamente 5 bilhões de casos por ano. É a segunda causa de morte em crianças abaixo de cinco anos de idade, sendo suplantada apenas por doenças do trato respiratório. Dentre seus agentes etiológicos, destacam-se as enterobactérias, entre elas, os membros do gênero *Shigella*. As bactérias deste grupo expressam inúmeros fatores de patogenicidade, responsáveis por processos de lesão ao epitélio intestinal que induzem resposta inflamatória marcante, característica da shigelose. Microrganismos em geral sintetizam uma série de substâncias de defesa, muitas das quais agem diretamente sobre outros organismos, contribuindo para sua permanência ou estabelecimento em ambientes densamente colonizados. Dentre estas substâncias, merecem menção as bacteriocinas, as quais já foram descritas para uma vasta gama de bactérias, inclusive *Shigella*. Dentre as bacteriocinas comumente sintetizadas por enterobactérias, destacam-se as colicinas, cuja produção já foi relatada para o gênero *Shigella*. O presente estudo investigou, empregando-se PCR, a presença de 20 determinantes colicinogênicos em amostras de *Shigella sonnei* e *Shigella flexneri* isoladas de crianças com diarreia infecciosa aguda. Dentre as 27 amostras empregadas nesta investigação, 16 de *S. sonnei* e 11 de *S. flexneri*, 10 (9 *S. sonnei* e 1 *S. flexneri*) apresentavam pelo menos um determinante colicinogênico. Metade das amostras que albergavam marcadores para colicinas exibiam mais de um marcador. Além disso, observou-se que todas as amostras positivas carreavam, no mínimo, um gene para a produção de colicina tipo E. Os resultados reforçam a necessidade de estudos mais detalhados relativos à produção de bacteriocinas por *Shigella*, inclusive, para avaliação da sua possível relação com doença diarréica aguda, possibilitando, também, uma melhor avaliação de seu potencial de aplicação biotecnológica.

**Palavras-chave:** colicinas, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, shigelose, doença diarréica aguda.

**Apoio financeiro:** CAPES, FAPEMIG, CNPq e PRPq/UFMG.



## **RESUMOS**

**Número: 143**

### **CONCENTRAÇÃO MINIMA INIBITÓRIA DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE URUCUM E ERVA CIDREIRA FRENTE A BACTÉRIAS ISOLADAS DE MASTITE**

Miranda, J. S.<sup>1</sup>; Baêta, J. V. P. B.<sup>1</sup>; Nascimento, F. R.<sup>1</sup>; Pizziolo, V. R.<sup>1</sup> e Diaz, M. A. N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, Brasil. E-mail: [jumiranda@outlook.com](mailto:jumiranda@outlook.com)

A mastite bovina pode ser responsabilizada por perdas econômicas que vão além da produtividade e qualidade do leite. Entre as perdas, estão os gastos em tratamentos, serviços veterinários e medidas preventivas. Nesta infecção, comumente são encontradas bactérias *Staphylococcus aureus*, que se alojam principalmente nas glândulas mamárias. Devido à capacidade adaptativa destes patógenos no interior do úbere, as infecções são difíceis de serem detectadas e curadas. O uso de produtos naturais surge como nova estratégia para o desenvolvimento de novas drogas frente às bactérias resistentes a antibióticos. O objetivo deste trabalho foi determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos etanólicos de erva cidreira (*Melissa officinalis*) e de urucum (*Bixa orellana*) contra estirpes de *S. aureus* isoladas de mastite bovina. As cepas de *S. aureus* 3008, 3828, 3917, 4157 e 4182 foram cedidas pela Embrapa/CNPGL - Juiz de Fora-MG. Para a determinação CIM foi utilizado o método de microdiluição em caldo BHI. Foi regulado a concentração  $10^6$  UFC/mL e foram adicionadas concentrações do extrato variando de zero até 10 mg/mL. O controle negativo foi constituído apenas por uma suspensão bacteriana e o positivo, uma suspensão bacteriana e antibiótico. As microplacas foram incubadas a 37°C por 24h, posteriormente coradas com resazurina a 3 mg/mL e incubadas à 37°C por 1h. A CIM foi definida pela menor concentração do extrato no qual não se observa mudança da coloração. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. O extrato de *M. officinalis* apresentou um CIM de 2,5 mg/mL para todas as cepas testadas e *B. orellana* apresentou MIC de 10mg/mL para a cepa 3008 e 5 mg/mL para as cepas 3917 e 4182. Estes resultados demonstram que os extratos testados apresentam potencial antibacteriano frente a bactérias isoladas da mastite, entretanto, o extrato de *M. officinalis* pode ser melhor considerado em virtude de ter apresentado menor MIC e resultado positivo para todas as cepas utilizadas.

**Palavras-Chave:** Mastite, Produtos Naturais, *Staphylococcus aureus*.

**Apoio Financeiro:** CNPq, CAPES, FAPEMIG,



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 144**

### **ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *in vitro* DO CETOCOCONAZOL CONTRA *Staphylococcus epidermidis***

Nascimento, L.A.A.<sup>1</sup>; Lima, W.G.<sup>1</sup>; Cruz, W.S.<sup>1,2</sup>; Palumbo JMC<sup>1</sup>; Ferreira, J.M.S.<sup>1</sup> Soares, A.C.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia Médica, UFSJ, Divinópolis, MG. <sup>2</sup>Laboratório de Biologia Molecular e Celular, Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos (DQBIO), UFSJ, Ouro Branco, MG.

<sup>3</sup>Laboratório de Farmacologia da Dor e Inflamação, UFSJ, Divinópolis, MG. lidia.anita@gmail.com

O reposicionamento de fármacos para tratamento de doenças bacterianas representa uma alternativa eficaz para evitar inúmeras dificuldades no desenvolvimento de um novo composto. Apesar do rápido desenvolvimento de resistência bacteriana aos novos antimicrobianos lançados no mercado nas últimas décadas, o investimento da indústria farmacêutica na prospecção dessas substâncias tem diminuído acentuadamente. Portanto, a investigação de atividade antibacteriana de princípios ativos já utilizados com outras finalidades representa como uma estratégia interessante. Sob essa perspectiva, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade *in vitro* do Cetoconazol frente a uma série de diferentes espécies de bactérias. O cetoconazol é um derivado sintético do imidazol dioxolano com atividade fungicida e fungistática e atua tanto na inibição da biossíntese do ergosterol como provoca alteração da composição lipídica da membrana no fungo. O método de microdiluição em caldo Sabouraud-Dextrose foi utilizado para avaliar a concentração inibitória mínima (CIM). As espécies *Escherichia coli* ATCC25922; *Enterobacter cloacae* ATCC23355; *Klebsiella pneumoniae* ATCC43816; *Proteus mirabilis* ATCC15290; *Acinetobacter baumannii* ATCC19606; *Lactobacillus plantarum* ATCC8014; *Listeria monocytogenes* ATCC15313; *Staphylococcus aureus* ATCC29213; *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228; *Staphylococcus saprophyticus* ATCC13305; *Streptococcus agalactiae* ATCC13813, 5 espécies gram negativas e 6 espécies gram positivas foram utilizadas para avaliação antibacteriana do Cetoconazol. O cloranfenicol e o DMSO foram utilizados como controles positivo e de solvente respectivamente. O CIM para *S. epidermidis* foi de 8 µg/mL e para o *S. aureus* 256 µg/mL. Para as outras bactérias testadas, o CIM foi superior a 512 µg/mL. Os resultados indicam uma atividade promissora do Cetoconazol contra *Staphylococcus epidermidis* indicando um potencial reposicionamento desse fármaco.

**Palavras Chave:** Repositionamento, antifúngico, gram positiva

**Apoio Financeiro:** CNPq, FAPEMIG, Capes, UFSJ



## **RESUMOS**

**Número: 145**

### **PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE BACTÉRIAS NÃO FERMENTADORAS EM PACIENTES INTERNADOS NO CENTRO DE TERAPIA INTENSIVA DE UM HOSPITAL PÚBLICO DE BELO HORIZONTE.**

MATA, C.P.S.M<sup>1</sup>; SILVA, T.R.N.<sup>2</sup>; ARAÚJO, C.A.<sup>1</sup>; CCIH<sup>3</sup>; ROCHA, M. G.L<sup>2</sup>.

1. Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Risoleta Tolentino Neves, Hospital Universitário Risoleta Tolentino Neves, FUNDEP/UFMG, Belo Horizonte, MG. 2. Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte, MG. 3. Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH), Hospital Universitário Risoleta Tolentino Neves, FUNDEP/UFMG, Belo Horizonte, MG.

A infecção relacionada à Assistência à Saúde é considerada um dos maiores problemas de saúde pública em todo mundo, causando morbidade e mortalidade, especialmente nos países em desenvolvimento. Nos centros de terapia intensiva (CTI) essas infecções são vistas com maior freqüência devido ao uso excessivo de antibióticos, práticas de isolamento inadequadas e estadias prolongadas de pacientes. Estima-se que entre 5% e 15% dos pacientes hospitalizados adquirem infecção durante a internação e que aproximadamente 25% a 40% recebem antimicrobianos para o tratamento ou profilaxia dessas infecções. O objetivo desse estudo foi determinar o perfil epidemiológico e microbiológico dos bacilos Gram-negativos não fermentadores em pacientes internados no CTI adulto do Hospital Público de Belo Horizonte, Minas Gerais. Foi realizada análise retrospectiva dos prontuários de registro do Laboratório de Análises Clínicas do HRTN no ano de 2016 por meio de banco de dados de pacientes adultos hospitalizados no CTI sem distinção de sexo e patologia. Dos 1.088 pacientes atendidos no CTI do HRTN, 321 pacientes apresentaram infecções hospitalares acometidas por *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* durante 2016, totalizando 29,5% das IH. Nesse grupo, houve à prevalência de 61,4% de *A. baumannii* e 14,3% de *P. aeruginosa*, e ambas as bactérias em 24,3% dos casos. Ainda, foi observado maior frequência de pacientes do sexo masculino, com idade entre 50 e 64 anos, com tempo médio de internação de 43 dias e taxa média de óbito de 78,9% para os pacientes acima de 80 anos. Portanto, é essencial a elucidação de aspectos clínicos e epidemiológicos das infecções causadas por estes patógenos, a fim de possibilitar o desenvolvimento de estratégias de controle e prevenção das respectivas infecções, bem como de abordagens terapêuticas mais eficazes a fim de prevenir e controlar futuros surtos endêmicos.

**Palavras-Chave:** Infecção hospitalar (IH), centro de terapia intensiva (CTI), bacilos gram-negativos não fermentadores (BGNNF), resistência antimicrobiana, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 146**

### **ANÁLISES FILOGENÉTICAS DE *Chlamydia psittaci* DE *Amazona aestiva* EM MINAS GERAIS**

Pinto, P. N.<sup>1</sup>; Mureb, E. M.<sup>1</sup>; Medeiros, L. B.<sup>1</sup>; Silva, A. S. G.<sup>2</sup>; Coelho, H. L.G.<sup>3</sup>; Costa, C. S.<sup>3</sup>; Vilela, D. A. R.<sup>4</sup>; Marín-Gómez, S. Y.<sup>5</sup>; Resende, M.<sup>5</sup>; Martins, N. R. S.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Programa de Residência Integrada em Medicina Veterinária da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais; <sup>2</sup>Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais <sup>3</sup>Graduanda em Medicina Veterinária da Escola de Veterinária da UFMG; <sup>4</sup>Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Belo Horizonte, MG, Brasil.

<sup>5</sup>Prof. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG. E-mail: priscilanatalia24@gmail.com

*Chlamydia psittaci* é bactéria intracelular obrigatória que pode produzir doença sistêmica e ocasionalmente fatal em aves e humanos. A infecção ocorre principalmente por inalação, e os sinais clínicos, geralmente inespecíficos, dependem de diversos fatores, relacionados à imunidade do hospedeiro e à patogenicidade da estirpe envolvida. *C. psittaci* encontra-se disseminada mundialmente, podendo causar problemas de saúde pública (zoonose), prejuízos à indústria avícola, e, ainda pouco estudados, impactos negativos na conservação das espécies. Objetivou-se realizar sequenciamento direto dos produtos da PCR, a caracterização genotípica das estirpes de *C. psittaci* encontradas em 13 papagaios (*Amazona aestiva*) provenientes de comércio ilegal e encaminhadas ao CETAS/BH, onde vieram ao óbito. Inicialmente, foi realizada necrópsia completa das aves, as coletas de amostras teciduais para PCR e avaliação histopatológica. O DNA total de pulmões, baço e fígado foi extraído pelo método de sílica, por adsorção às partículas de cristais de dióxido de silício. As reações de PCR foram previamente descritas para amplificação parcial do gene *ompA* (418pb) que codifica a proteína A da membrana externa de *C. psittaci*. Os produtos foram submetidos ao sequenciamento por dideoxidonucleotídeos (Sanger). As sequências nucleotídicas foram alinhadas com sequências depositadas no GenBank e as árvores filogenéticas foram construídas por *neighbor-joining* com o auxílio do programa MEGA7. Foi confirmada por histopatologia, PCR e sequenciamento a presença da *C. psittaci* nas amostras, com quadro compatível de clamidiose. A análise filogenética das sequências do gene *ompA*, demonstrou que todas as estirpes pertencem ao genótipo A de *C. psittaci*. A infecção pelo genótipo A de *C. psittaci* pode estar associada à mortalidade dos papagaios em triagem. O genótipo A, além de ser associado à mortalidade em psitacídeos, tem o agravante de apresentar estirpes de reconhecido potencial patogênico para humanos.

**Palavras chave:** Clamidiose, psitacose.

**Apoio Financeiro:** CAPES, CNPq, FAPEMIG.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 147**

### **TERAPIA COM ANTITOXINA EM AVES EM SURTOS NATURAIS DE BOTULISMO EM MINAS GERAIS, BRASIL**

Silva, A. S. G.<sup>1</sup>, Silva, R. O. S.<sup>1</sup>, Oliveira, C. A. J.<sup>1</sup>, Queiroz, G. A.<sup>1</sup>, Favoretto, S.<sup>1</sup>, Medeiros, L. B.<sup>1</sup>, Marques, M. V. R.<sup>1</sup>, Pinto, P. N.<sup>1</sup>, Mureb, E. N.<sup>1</sup>, Gómez, S. Y. M.<sup>1</sup>, Lobato, F. C. F.<sup>1</sup>, Martins, N. R. S<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, UFMG.  
E-mail: ailavet@yahoo.com.br

O botulismo é uma intoxicação decorrente da ingestão de toxina produzida por *Clostridium botulinum* e pode acometer animais e humanos. Sua ocorrência é comum nas aves aquáticas (Anseriformes), embora um número crescente de casos tem sido registrado em Minas Gerais, em espécies domésticas, como galinhas e também em aves silvestres, na rotina laboratorial do Setor de Doenças das Aves (EV-UFMG). No presente estudo descrevem-se surtos de botulismo ocorridos entre 2014 e 2016 em plantéis de jacutinga (*Aburria jacutinga*), pato selvagem (*Cairina moschata*), pato doméstico (*Anas platyrhynchos*) e galinha (*Gallus gallus domesticus*). As aves foram encaminhadas em épocas distintas, inicialmente em patos e galinhas de subsistência de uma mesma propriedade e, posteriormente, em jacutingas de um criatório conservacionista. Patos domésticos e selvagens mantidos em lago artificial da região metropolitana de Belo Horizonte foram também estudados. Os surtos envolveram aves com paralisia flácida dos músculos do pescoço, asas e pernas, incoordenação, pálpebras semi fechadas, inatividade e alheios à oferta de água e comida. Um total de 29 aves foram submetidas a tratamento utilizando-se soro anti botulínico C/D comercial (Vencofarma, Brasil) na dose entre 500 e 1000 unidades neutralizantes por ave, via intramuscular. Das aves submetidas à soroterapia antibotulínica, 28 (96,5%) apresentaram progressiva recuperação entre 24 e 72 horas, com retorno à atividade, alimentação e coordenação motora normal. Não houve sucesso com o tratamento em uma ave, atendida em estágio avançado de desidratação. Na literatura científica, são escassos os registros sobre o tratamento sorológico contra o botulismo em aves. A falta de documentação sobre a terapia pode estar na não divulgação dos casos, ou pelo fato de as aves chegarem ao óbito antes de um possível tratamento. Conclui-se que a terapia com antitoxina mostrou-se eficaz no tratamento das aves com quadros leves, assim como nas gravemente afetadas.

**Palavras chaves:** Botulismo, soroterapia, antitoxina, aves

**Apoio financeiro:** CAPES, CNPq, FAPEMIG.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 148**

**PONTOS CRÍTICOS DE CONTAMINAÇÃO DOS FRANGOS DE CORTE POR  
*Campylobacter* spp. EM GRANJAS AVÍCOLAS**

Silva, T.M.L.<sup>1</sup>; Assis, D.C.S.<sup>1</sup>, Brito, R.F.<sup>1</sup>, Dias, R.G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: thaismichelle02@hotmail.com

A avicultura brasileira passou por grandes transformações nas últimas décadas, colocando o Brasil em posição de destaque no ranking mundial de produção de carne de frango, sendo o segundo maior produtor e o maior exportador desse produto. A elevada eficiência produtiva e o menor ciclo de produção tornaram a avicultura uma das formas mais baratas de se produzir proteína animal. Por ser rica em nutrientes e apresentar alta atividade de água, a carne de frango pode se tornar substrato para a proliferação microbiana, o que aumenta a susceptibilidade à deterioração e à ocorrência de doenças transmitidas por alimentos (DTA). A elevada temperatura corporal das aves (42°C) faz com que elas se tornem reservatórios de *Campylobacter* spp.. Este micro-organismo pode contaminar a carne de frango e se tornar um importante agente causador de DTA. A contaminação das aves começa nas granjas, e pode ocorrer tanto por meio da transmissão vertical, quanto da horizontal, sendo a última forma, a mais importante. Uma das principais formas de contaminação horizontal é o contato das aves com as fezes contaminadas. Antes mesmo da chegada dos pintinhos de um dia à granja, estes podem se contaminar durante incubação de ovos mal higienizados. Ao chegar à granja, atenção deve ser dada à cama, que deve estar bem armazenada, e também se deve evitar contato com animais silvestres ou até mesmo com outras aves contaminadas. Utensílios utilizados na granja, quando compartilhados entre os galpões podem servir como fômites, carreando a contaminação entre os lotes. Entretanto, os riscos individuais ou associados para a contaminação deste micro-organismo nas granjas podem ser diminuídos. Um manejo adequado durante a criação dos frangos de corte pode reduzir de forma significativa o número de bactérias do gênero *Campylobacter* spp. presentes no organismo desses animais, reduzindo o número de aves contaminadas que chegam ao abatedouro frigorífico evitando, consequentemente, a contaminação das carcaças.

**Palavras-chave:** Avicultura de corte, *Campylobacter*, doenças transmitidas por alimentos.



## **RESUMOS**

**Número: 149**

### **PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE UROPATÓGENOS RECUPERADOS DE PACIENTES COM INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO RELACIONADA À ASSISTÊNCIA À SAÚDE ASSOCIADA A CATETER VESICAL (ITU-RAS-AC)**

Souza, A.F.I.<sup>1,2</sup>; Nardi, R. M. D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. <sup>2</sup>Hospital São Carlos, Lagoa da Prata, MG.

O uso de cateter vesical de demora (CUD) é fator de risco para aquisição de ITU-RAS-AC, contribuindo para o aumento da morbimortalidade dos pacientes, tempo de internação e custos hospitalares. Adicionalmente, a multirresistência dos uropatógenos leva a falha na terapia antimicrobiana empírica em pacientes críticos. Assim, o conhecimento do perfil de susceptibilidade dos microrganismos associados a essa infecção contribui para a escolha adequada do antimicrobiano. Nesse trabalho, analisou-se o banco de prontuários de pacientes adultos internados na Unidade de Terapia Intensiva do Hospital São Carlos, Lagoa da Prata, MG, no período de junho de 2015 a junho de 2016. Dos 387 pacientes atendidos, 120 foram submetidos ao CUD, dos quais 30,8% tiveram ITU-RAS-AC. A faixa etária predominante foi acima dos 60 anos de idade. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os gêneros ( $P>0,05$ ). Isolou-se um microrganismo por cultura, com contagem  $\geq 10^5$  UFC/mL de urina. A identificação dos microrganismos, a concentração inibitória mínima e a produção de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBLs) foram determinadas pelo VITEK II. *Escherichia coli* (46%) e *Klebsiella pneumoniae* (18,9%) foram as mais prevalentes ( $P<0,05$ ), seguidas por: *Enterobacter cloacae* (5,4%), *Citrobacter youngae* (2,7%), *C. freundii* (2,7%), *Acinetobacter baumannii* (2,7%), *Pseudomonas aeuroginosa* (2,7%), *Staphylococcus epidermidis* (2,7%) *S. haemolyticus* (2,7%), *S. saprophyticus* (2,7%), *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico (2,7%), *Candida tropicalis* (5,4%) e *C. albicans* (2,7%). De um total de 30 bactérias Gram-negativas e quatro Gram-positivas, dez e três classificaram-se como multirresistentes a três e seis classes de antimicrobianos, respectivamente. Por outro lado, as leveduras foram sensíveis aos antifúngicos testados. ESBLs foram detectadas em *E. coli* (6/17). Estudo de coorte retrospectivo constitui base científica relevante em programas local de controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde.

**Palavras chave:** Infecção do trato urinário, cateter vesical, uropatógenos, perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

**Apoio Financeiro:** CNPq, CAPES e FAPEMIG



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 150**

### **POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE FRAÇÕES DE *Croton urucurana* Baill**

Souza, I. G. A.<sup>1</sup>; Silva, C. G.<sup>1</sup>; Almeida, V. L.<sup>1</sup>; Scoaris, D. O.<sup>1</sup>; Silva, A. F.<sup>2</sup> Campana, P. R. V.<sup>1</sup>;

<sup>1</sup>Serviço de Fitoquímica e Prospecção Farmacêutica; Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil; <sup>2</sup>Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. E-mail: isadora.souza@funed.mg.gov.br

A busca por novas opções terapêuticas para tratar doenças bacterianas vem sendo necessária, devido ao aumento da resistência de algumas bactérias aos medicamentos disponíveis. Com isso, espécies vegetais têm sido testadas por possuírem substâncias com reconhecida atividade antimicrobianas. Esse estudo teve como intuito analisar o potencial bioativo de frações de *Croton urucurana* Baill. *Croton* é um grande gênero da Euphorbiaceae, característico de matas ciliares podendo ser encontrado em regiões tropicais e subtropicais nos dois hemisférios. Ainda existem poucos estudos fitoquímicos sobre a espécie *Croton urucurana*, porém na medicina tradicional, ela é comumente utilizada no tratamento do reumatismo e na cura de infecções em feridas, o que pode ser um indicativo de atividade antimicrobiana. Para essa análise, a planta foi coletada em área de cerrado em Minas Gerais. As folhas foram secadas e moídas. O pó (10 g) foi percolado utilizando como solvente EtOH:H<sub>2</sub>O (8:2), em que se obteve o extrato etanólico (EEF) que foi secado e liofilizado. O EEF foi particionado utilizando Acetato de etila, Butanol, Diclorometano, Hexano e Metanol. O extrato bruto e as frações obtidas foram avaliados pela técnica de microdiluição em caldo, segundo CLSI/NCCLS (2003), com adaptações, frente à *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 11775). São consideradas promissoras aquelas amostras que apresentam %I > 50%. Dentre as analisadas, a porcentagem de inibição variou entre 35% a 45 %, para a bactéria *S.aureus*, enquanto para a *E.coli* variou entre 30% a 40% sendo consideradas bacteriostáticas. Portanto, as amostras não demonstraram atividade promissora frente aos microrganismos avaliados. Desta forma, é necessário avaliar o extrato e suas frações frente a outras cepas e/ou outras bactérias. Os resultados preliminares não confirmaram o uso medicinal relatado para esta espécie, porém análises estão em continuidade visando aplicações terapêuticas da planta.

**Palavras-chaves:** *Croton urucurana*, atividade antibacteriana, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

**Apoio Financeiro:** FAPEMIG e Fundação Ezequiel Dias



## **RESUMOS**

**Número: 151**

### **A PREVALÊNCIA DE CEPAS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA E O PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE EM CORRIMÕES INTERNOS DE DUAS ROTAS DE TRANSPORTE COLETIVO DE BELO HORIZONTE – MG.**

Quaresma, T.P.<sup>1</sup>; Teles, N.J.T.<sup>1</sup>; Fonseca, P. F.<sup>2</sup>; Costa, P. S.<sup>1</sup>; Paiva, L. F. R<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Instituto de ciências Biológicas do Centro Universitário UNA – Campus Guajajaras (Rua Dos Guajajaras, 175 - Centro, Belo Horizonte- MG, 30180-100).<sup>2</sup> Setor De Microbiologia - Unidade Funcional De Patologia e Medicina Laboratorial – Hospital Das Clínicas / UFMG (Avenida Alfredo Balena, 190 – 2º Andar, Santa Efigênia– 30.130-100).

Atualmente, o transporte coletivo é usado por um grande índice da população para realizar tarefas do dia a dia, onde os usuários estão expostos a vários parasitas e bactérias oportunistas. Um dos principais problemas de saúde pública no mundo é o uso indiscriminado de antimicrobianos, o que vem aumentando o risco de seleção de cepas bacterianas resistentes. Neste trabalho avaliou-se a incidência de micro-organismos encontrados no transporte público de Belo Horizonte de duas rotas distintas, sendo uma central (RC) e outra hospitalar (RH). Realizou-se, em setembro de 2016 a coleta com *swabs* estéreis de 27 amostras, que foram acondicionadas em meio de transporte Stuart e cultivadas em meios de cultura e analisadas no laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas do Centro Universitário UNA/Campus Guajajaras. As amostras classificadas como Gram-positivas foram identificadas através de testes bioquímicos e as Gram-negativas foram identificadas através do sistema automatizado VITEK® 2 Compact bioMerieux e foram paralelamente submetidas ao teste de susceptibilidade aos antimicrobianos. Os gêneros bacterianos e as espécies encontradas foram: *Bacillus* spp. (RH / RC), *Enterococcus* spp. (RH / RC), *Staphylococcus* spp. (provável coagulase negativa) (RH / RC), *Enterococcus faecium* (RH), *Escherichia coli* (RH), *Escherichia hermannii* (RH), *Leclercia adenocarboxylata* (RH), *Pseudomonas stutzeri* (RH), *Cronobacter sakazakii* (RH), e *Pantoea agglomerans* (RC). As espécies bacterianas predominantes nas duas rotas foram *Bacillus* spp. e *Staphylococcus* spp (provável coagulase negativa). As espécies bacterianas submetidas ao teste de susceptibilidade apresentaram resultados sensíveis a todos os antimicrobianos utilizados, com exceção de *E. faecium*, que apresentou perfil de resistência à Ciprofloxacina. As superfícies como barras de ônibus podem albergar micro-organismos potencialmente patogênicos, sendo necessário eficaz higienização e medidas em promoção da saúde pública.

**Palavras-Chave:** Ônibus, micro-organismos patogênicos, fômites, enterobactérias, resistência antimicrobiana.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 152**

**PAPEL DE SOCS2 NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE E PERDA ÓSSEA ALVEOLAR NA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL INDUZIDA POR AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS**

Santos, M.R.G.<sup>1</sup>; Chaves, I.M.<sup>2</sup>; Machado, F.S.M.<sup>1</sup>; Madeira, M.F.M.<sup>2</sup>.

1-Laboratório de Imunorregulação de Doenças Infecciosas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. 2- Laboratório de Interação Microrganismo Hospedeiro, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. E-mail: mariana\_rates@hotmail.com.

A doença periodontal (DP) é uma doença inflamatória que leva a perda das estruturas de suporte dentário. A patogênese da DP é resultado de interações complexas entre o biofilme e a resposta do hospedeiro que resulta em disbiose e desregulação da resposta inflamatória. As citocinas pró-inflamatórias e os mediadores lipídicos desempenham um papel crítico na destruição do tecido periodontal. Além de serem reguladas por mediadores anti-inflamatórios, sua atividade está sob controle de supressores de sinalização de citocinas (SOCS), que são reguladores endógenos da via JAK/STAT. As proteínas SOCS podem ser induzidas em resposta a uma vasta gama de citocinas com atividades pró e anti-inflamatórias, controlando a diferenciação de células imunes, e moldando, portanto, a resposta inflamatória. Deste modo, o objetivo deste estudo foi determinar o papel de SOCS2 na modulação das respostas do hospedeiro durante a DP experimental induzida por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa). No presente estudo, a reabsorção óssea alveolar foi induzida por DP experimental através da inoculação oral de Aa em camundongos fêmeas selvagens e *knockout* para SOCS2 (SOCS2<sup>-/-</sup>). Camundongos selvagens e SOCS2<sup>-/-</sup> que foram sujeitos a inoculação oral de Aa, apresentaram maior acumulação de neutrófilos. Além disso, camundongos SOCS2<sup>-/-</sup> apresentaram maiores níveis de perda óssea quando comparados a camundongos selvagens. Em conclusão, nossos resultados preliminares demonstram que SOCS2 pode apresentar um papel importante durante o controle da resposta inflamatória e perda óssea alveolar na patogênese da doença periodontal experimental induzida por Aa.

**Palavras-chave:** Doença periodontal, SOCS2, *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*.  
**Apoio financeiro:** CAPES



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 153**

### **EFFICIENCY ANALYSIS OF THE MODIFIED HODGE TEST THROUGH RESULTS WITH THE MOLECULAR GENE DETECTION TESTS *blaKPC***

Silva L.S<sup>1,2</sup>; Silveira, J.N<sup>1</sup>; Carmo, T.<sup>1</sup>; Costa, P. S.<sup>1</sup>; Meireles, P.N.M.<sup>2</sup>; Paiva, L. F. R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde do Centro Universitário UNA, Belo Horizonte/ MG (Rua dos Guajajaras, 175 - Centro, Belo Horizonte - MG, 30180-100)

<sup>2</sup>Laboratório Núcleo de Assistência Hematológica, Belo Horizonte/ MG (Alameda Ezequiel Dias, 389 - 2º andar - Centro, Belo Horizonte - MG, 30130-110)

Antimicrobial resistance is a major public health problem worldwide and involves several factors. KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) is a β-lactamase/carbapenemase enzyme, which confers resistance to several antimicrobials classes, including carbapenems, and is easily disseminated in the hospital environment, produced mainly by *Enterobacteriaceae* family. This carbapenemase is encoded by the *blaKPC* gene, located on a mobile plasmid, which facilitates its dissemination. The identification of KPC producing bacteria occurs through a series of biochemical tests, antimicrobial susceptibility profile verification and several phenotypic and molecular tests to verify resistance mechanisms. Modified Hodge Test (THM) is a phenotypic test used to detect the possible production of carbapenemases. Currently, it is stated that the sensitivity of this test is 100% and its specificity is 98%, and false positives may occur in 2% of study cases. This phenotypic test has the advantage of identify carbapenemase producers besides being easy to perform and available for laboratory routine. The objective of this study was to verify the efficacy of THM for the detection of KPC carbapenemases in *Enterobacteriaceae* and confirm through the results of Polymerase Chain Reaction (PCR), a molecular method considered golden pattern in the detection of genes responsible for the production of this enzyme. Results confirmed that the production of the KPC enzyme is not restricted to *Klebsiella pneumoniae* and can be synthesized by several other *Enterobacteriaceae*. The efficacy of THM was confirmed, and the *blaKPC* gene could be detected by PCR in 99% of suspected THM positive strains and only 1% was found to be false positive, with positive THM and negative PCR. In this way, THM it is considered an effective and reliable method for the identification of KPC enzyme producing bacteria, and that it can be easily implemented in the laboratory routine due to its low cost and for being easy to execute.

**Palavras-chave:** *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, *Enterobacteriaceae*, β-lactamase, Multiresistance, Modified Hodge Test, *blaKPC* gene.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 154**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE UM COMPOSTO INÉDITO  
PARA UMA CEPA RESISTENTE DE *Candida albicans***

Nascimento, L.A.A.<sup>1</sup>; Lima, W.G.<sup>1</sup>; Andrade, J.T.<sup>1</sup>; Cruz, W.S.<sup>1,2</sup>; Ferreira, J.M.S.<sup>1</sup> Soares, A.C.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia Médica, UFSJ, Divinópolis, MG. <sup>2</sup>Laboratório de Biologia Molecular e Celular, Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos (DQBIO), UFSJ, Ouro Branco, MG.

<sup>3</sup>Laboratório de Farmacologia da dor e Inflamação, UFSJ, Divinópolis, MG. lidia.anita@gmail.com

A alta prevalência de infecções causadas por *Candida albicans* em indivíduos imunocomprometidos associada com o alto custo e o surgimento de resistência aos antifúngicos disponíveis no mercado se apresenta como uma área promissora para busca de novas substâncias com potencial de combater infecções nas quais os fungos são os agentes etiológicos. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica de um composto sintético inédito sobre uma cepa de *Candida albicans* resistente à Fluconazol, Cetoconazol, Itracozol e Caspofungina. A atividade antifúngica foi avaliada a partir do método de microdiluição em caldo Sabouraud-Dextrose pela concentração inibitória mínima e posteriormente a concentração fungicida mínima (CFM) foi também determinada. A espécie *Candida albicans* ATCC10231 foi empregada para a avaliação da atividade antifúngica do composto e o Cetoconazol, a Nistatina e o DMSO foram utilizados como controles positivos e controle do solvente respectivamente. O composto genericamente denominado B<sup>pHexR</sup> apresentou CIM e CFM de 64 µg/mL enquanto o Cetoconazol e a Nistatina exibiram CIM de 128 e 4 µg/mL, respectivamente. O CFM para o Cetoconazol foi maior que 128 e para a Nistatina de 4 µg/mL. Os resultados apontam para uma potencial atividade antifúngica *in vitro* do composto B<sup>pHexR</sup> e estudos sequenciais de toxicidade e *in vivo* devem ser feitos para uma melhor elucidação de propriedades farmacológicas desse composto.

**Palavras Chave:** Resistência, atividade antifúngica, composto original

**ApoioFinanceiro:** CNPq, FAPEMIG, CAPES, UFSJ



## RESUMOS

Número: 155

### AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE TRANSMISSÃO VERTICAL DE LEVEDURAS PATOGÊNICAS E SEUS EFEITOS SOBRE A FERTILIDADE NO MODELO INVERTEBRADO ALTERNATIVO *Caenorhabditis elegans*

Ricoy, A.C.S.<sup>1,2</sup>; Silva, A.P.R<sup>2</sup>; Alves, V.S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia Celular de Micro-organismos, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. <sup>2</sup>Centro Universitário UNA, Belo Horizonte, MG.

Nas ultimas décadas os fungos reemergiram como importantes causadores de doenças humanas eventualmente fatais. Das mais de 150.000 espécies, cerca de 600 espécies são patógenos humanos que podem causar infecções superficiais e profundas, com potencial para óbito dos acomentido. Apesar da existência de numerosos estudos aprofundados sobre as doenças causadas por *Malassezia furfur*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, pouco se sabe sobre o potencial de transmissão vertical destes patógenos e sobre os eventuais efeitos sobre a fertilidade pós infecção. Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial de transmissão vertical de *M. furfur*, *C. albicans*, *C. neoformans* e *C. gattii* e seus efeitos sobre a fertilidade no modelo invertebrado *Caenorhabditis elegans*. Para avaliação *in vivo* os *C. elegans* foram infectados e a progênie foi quantificada e avaliada quanto à presença dos patógenos por determinação de UFC/ mL, para primeira e segunda geração de *C. elegans*, diluição seriada ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ) do macerado de *C. elegans* da progênie L1, e estas plaqueadas em BHI ágar. Após 48h de incubação à temperatura ambiente, foi feita a contagem das colônias correspondentes às leveduras testadas. Para analisar a fertilidade L1 de 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> gerações foram também contabilizados por observação e registro fotográfico. Os dados obtidos demonstraram que a infecção pelas leveduras patogênicas utilizadas no estudo é transmitida para a progênie de *C. elegans*. Ainda, ocorreu diminuição significativa no tamanho da progênie do nematódeo pós infecção com *M. Furfur* (19,8%), *C. neoformans* (26%) e *C. gattii* (36,9%), quando comparada ao controle que foi considerado 100% para as análises de transmissão e fertilidade. Os dados sugerem que agentes de micoses superficiais e sistêmicas/ oportunistas podem ser transmitidos para a progênie de nematódeos, bem como a infecção interfere com a fertilidade no modelo testado.

**Palavra chave:** *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, transmissão vertical.

**Apoio Financeiro:** Capes



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 156**

### **EFEITOS DA PIOGLITAZONA NO TRATAMENTO DA CRIPTOCOCOSE**

Santos, A.P.N<sup>1</sup>; Ribeiro, N.Q.<sup>1</sup>; Costa, C.M.<sup>1</sup>; Oliveira, L.V.N<sup>1</sup>; Emidio, E.C.P.<sup>1</sup>; Santos, D.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Microbiologia, Laboratório de Micologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. E-mail: andersonpns.ufmg@gmail.com

A criptococose é uma micose invasiva associada a elevados índices de mortalidade, devido a falhas no diagnóstico, a limitações terapêuticas e a resistência antimicrobiana. A anfotericina b, trata-se de um polieno amplamente utilizado para o tratamento dessa enfermidade, porém, apesar de apresentar boa eficácia terapêutica, essa droga está associada a elevado custo e toxicidade, o que muitas vezes limita a sua utilização. Nesse sentido, o reposicionamento de fármacos trata-se de uma alternativa promissora como forma de reverter esse cenário. Dessa maneira, este estudo objetivou avaliar o efeito da Pioglitazona (PIO) sozinha e em combinação com Anfotericina B (ANF) no tratamento da criptococose causada por *C. gattii*. Para isso, foram utilizadas estratégias experimentais *in vitro* e *in vivo*. Nos ensaios *in vitro*, foram avaliados a taxa de fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e o índice de proliferação intracelular (IPR) em macrófagos derivados da medula. No ensaio *in vivo*, foram estabelecidos os seguintes grupos: 1)NT (não tratado) 2)NI (Não Infectado) 3)ANF 0,5 mg/Kg 4)PIO 6,7 mg/Kg ;5)PIO 6,7mg/Kg+ANF 0,5mg/Kg. Camundongos foram infectados via intratraqueal e avaliados quanto a sobrevida, o comportamento neuromotor, a recuperação de unidades formadoras de colônia (cérebro e pulmão) e recrutamento celular do lavado broncoalveolar. Na combinação de PIO+ANF foi observado um aumento na produção de ROS e redução do IPR após infecção. Além disso, a combinação *in vivo* aumentou a sobrevida dos animais e reduziu as alterações comportamentais em relação aos grupos não tratados e tratados com monoterapia. O grupo tratado com PIO+ANF também apresentou menor carga fúngica no cérebro e pulmão, além de reduzido recrutamento neutrófilico, evidenciando melhor “clearance” do fungo e resolução da resposta inflamatória. Nossa estudo sugere que a combinação de PIO+ANF pode ser uma alternativa promissora para o tratamento da criptococose.

**Palavras chave:** *Cryptococcus gattii*, pioglitazona, reposicionamento de fármaco.

**Apoio Financeiro:** CNPq, CAPES e FAPEMIG.



## **RESUMOS**

**Número: 157**

### **PAPEL DA DIETA RICA EM FIBRA (PREBIÓTICO) NO TRATAMENTO DA MUCOSITE EM MODELO EXPERIMENTAL MURINO**

**Gabriela L. de Moura<sup>1,2</sup>, David<sup>3</sup>, Victor Melo<sup>1,3</sup>, Marcella Rungue<sup>1,3</sup>, Jacques R. Nicoli<sup>2</sup>, Flaviano dos Santos Martins<sup>2</sup> e Angélica T. Vieira<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Laboratório de Microbiota e Imunomodulação, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG.

<sup>2</sup> Laboratório de Agentes Bioterapêuticos, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG.

<sup>3</sup> Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG.

A mucosite é um dos principais efeitos colaterais do tratamento oncológico caracterizada por inflamação, perda da barreira epitelial e alterações da microbiota intestinal. O objetivo principal desse trabalho foi avaliar o efeito da fibra como potencial prebiótico, no modelo murino de mucosite. Camundongos fêmeas C57BL/6 tratados ou não durante 14 dias com uma dieta padrão AIN93M rica em fibra solúvel (Pectina 10%) aforam induzidos mucosite pela injeção intraperitoneal de Irinotecano (75mg/kg) durante 3 dias consecutivos. Após 5 dias a contar do primeiro dia de indução, foi avaliado o score clínico, e o sangue foi coletado para a avaliação da permeabilidade intestinal pelo método de detecção de fluorescência por FITC-dextran. Os animais foram eutanasiados para a retirada do fígado, intestino delgado e cólon para quantificação de células inflamatórias e análise histopatológica. O conteúdo intestinal dos animais também foi coletado para análise da microbiota pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) por meio de cultivo-dependente. Camundongos tratados com fibra, e com o ácido graxo de cadeia curta, acetato (produto do metabolismo microbiano pela fibra) apresentaram melhorias dos sinais clínicos, como redução da perda de peso, diarréia, sangue nas fezes e redução na permeabilidade intestinal quando comparados com os animais não tratados e com mucosite. Foi observado alteração na microbiota intestinal, com aumento da diversidade de bactérias nos animais tratados com fibras e redução nos animais com mucosite. Foi observado aumento de celulas inflamatórias no intestino dos animais com mucosite mas uma redução nos animais com mucosite tratados com fibra ou acetato. Dessa forma, os dados sugerem que os mecanismos pelos quais a dieta rica em fibra exerce seu efeito antiinflamatório, parece ser em parte devido a produção do metabólito acetato. O uso da dieta rica em fibra solúvel parece ser uma potencial estratégia terapêutica para pacientes com mucosite.

**Palavras-chave:** mucosite, inflamação, dieta, fibras, acetato, prebiótico.

**Apoio Financeiro:** CAPES, FAPEMIG, CNPq



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 158**

### **CARACTERIZAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE *Staphylococcus aureus* NA PROGRESSÃO DA CRIPTOCOCOSE EXPERIMENTAL.**

Peres-Emidio, E. C.<sup>1</sup>; Costa, M. C.<sup>1</sup>; Santos, A. P. N.<sup>1</sup>; Oliveira, L. V. N.<sup>1</sup>; Bastos, R. W.<sup>1</sup>; Santos, J. R. A.<sup>2</sup>; Santos, D. A.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Microbiologia, Laboratório de Micologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade CEUMA, São Luís, Maranhão, Brasil.

Coinfecção ou doenças polimicrobianas envolvem dois ou mais microrganismos que atuam de forma concomitante/sinérgica ou sequencial, podendo envolver condições agudas ou crônicas. A criptococose é uma infecção fúngica, causada por leveduras do gênero *Cryptococcus* spp., que apresenta distribuição geográfica universal e acomete mais de um milhão de pessoas por ano em todo o mundo. *Staphylococcus aureus* é um patógeno oportunista, que pode colonizar as superfícies de mucosas de indivíduos hígidos, atua como principal agente causador de pneumonia nosocomial. Além disso, vários estudos confirmaram *S. aureus* como um dos principais microrganismos envolvidos em infecções polimicrobianas. O presente projeto tem como objetivo principal avaliar a influência da infecção pela bactéria *S. aureus* na progressão da criptococose murina. Para tanto, foram utilizados modelo de infecção intranasal com  $10^7$  UFC de *S. aureus* e modelo de infecção intratraqueal com  $10^4$  células viáveis de *C. gattii* e foram avaliados perfil de sobrevida e comportamento pelo protocolo SHIRPA. Resultados preliminares mostraram um aumento na sobrevida e reduzida morbidade dos animais previamente infectados com a bactéria (S.a. 4 dias antes de C.g.) quando comparados com os animais infectados com *S. aureus* 4 dias após a infecção por *C. gattii* (S.a. 4 dias após C.g.) ou somente infectados com *C. gattii* (C.g.), sendo o primeiro grupo com média de sobrevida de 10 dias a mais que os outros dois grupos testados. Perspectivas de novas análises poderão esclarecer a translocação dos microrganismos a partir dos pulmões para outros órgãos e a resposta inflamatória. A exposição a uma infecção anterior pode exercer efeito modulador na resposta a infecções futuras, influenciando o resultado e o prognóstico das doenças. Dessa forma, este projeto pretende contribuir ampliando a compreensão da patogênese da criptococose e avaliar novas possibilidades de tratamentos complementares ao medicamentoso já existente.

**Palavras-chave:** coinfecção, criptococose, *Cryptococcus gattii*, *Staphylococcus aureus*.

**Apoio Financeiro:** CAPES, CNPq e FAPEMIG.



## **RESUMOS**

**Número: 159**

### **PAPEL DA FOSFATIDILINOSITOL-3-CINASE GAMA NA EVOLUÇÃO DA PARACOCCIDIODOMICOSE EXPERIMENTAL E NA FAGOCITOSE DE *Paracoccidioides brasiliensis* POR MACRÓFAGOS MURINOS**

Ribeiro, G. F.; Baltazar, L. M.; Santos, P.C.; Souza, D. G.

Laboratório de Interação Microrganismo-Hospedeiro, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. E-mail: [souzadg@gmail.com](mailto:souzadg@gmail.com)

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma infecção sistêmica tendo como um de seus agentes etiológicos o fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. Durante a infecção pode haver disseminação do fungo, ou controle por células do sistema imune inato. Porém, pouco se sabe sobre os mecanismos referentes a esse controle. A coordenação da resposta imune está intimamente relacionada à ativação da via da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K), sendo que em macrófagos (MØs) essa ativação está envolvida com aumento da fagocitose de patógenos por estar associada à maturação de fagossomos. Logo, o estudo do papel da PI3K no curso de PCM e de eventos relacionados à fagocitose de *P. brasiliensis* é importante. Assim, o presente projeto objetiva avaliar a relação entre a via da PI3K, com enfoque na PI3K $\gamma$ , e a evolução da PCM em modelo murino. Inicialmente foram realizados experimentos *in vitro* com MØs derivados de medula óssea de camundongos WT e PI3K $\gamma^{-/-}$ . Os MØs foram desafiados com *P. brasiliensis* na proporção de 5 MØs para 1 fungo e incubados por 3, 6 e 24 horas, para o cálculo dos índices fagocíticos (IF) e capacidade dos macrófagos em inativarem o fungo (CMIF). O IF foi quantificado por contagem de lamínulas; e o CMIF foi avaliado por cultivo do sobrenadante de cada poço somado ao lisado em meio BHI suplementado. Ademais, foi mensurado os níveis de produção de óxido nítrico (RNS) por Griess 3 e 6 horas após desafio dos MØs. No ensaio *in vivo* foi avaliada comparativamente a carga fúngica no tecido pulmonar de ambos os grupos, plaqueados 7 dias após infecção intratraqueal. Os resultados preliminares indicam que a PI3K $\gamma$  é importante no controle da PCM por fagocitose de *P. brasiliensis*, havendo simultaneamente redução da carga fúngica pulmonar; da fagocitose; e da viabilidade das células fúngicas e aumento da produção de RNS em MØs de animais *knockout* comparado com WT. De todo modo, pesquisas adicionais sobre outras vias relacionadas a essa proteção do hospedeiro são necessárias.

**Palavras chave:** *Paracoccidioides brasiliensis*, PI3K $\gamma$ , paracoccidioidomicose, fagocitose, macrófagos murinos

**Apoio Financeiro:** CNPq



## **RESUMOS**

**Número: 160**

### **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE INIBIÇÃO DA *Portulaca oleracea* (BELDROEGA) SOBRE O CRESCIMENTO DO FUNGO *Candida albicans*, CAUSADOR DA CANDIDÍASE**

Rocha, M.L.; CÂNDIDO, A.P.S.; SILVA, S.F.M.; CASTELUBER, M.C.F.

Laboratório de Microbiologia Aplicada (LAMAP), Ciências Biológicas, Universidade do Estado de Minas Gerais, Ibirité, MG. E-mail: marinalorentz@gmail.com.

O estudo da Biologia requer dos alunos um esforço em imaginar alguns acontecimentos em nível de célula, tecidos ou seres vivos microscópicos que pode ser de difícil entendimento em alguns casos. As aulas práticas podem se constituir em uma das possíveis soluções para esse problema, pois permitem aos alunos construírem o conhecimento de forma investigativa e a visualizarem alguns processos biológicos. Esse estudo propôs testar uma possibilidade de aula prática interdisciplinar que aborda o Conhecimento Popular, Botânica, Microbiologia e Saúde. Através do método de disco de difusão em ágar, foi testado se a Planta Alimentícia Não Convencional (PANC) *Portulaca oleracea* (Beldroega) inibia o crescimento do fungo *Candida albicans*, causador da Candidíase humana. Foram utilizados dois tipos de extratos alcoólicos de beldroega nos testes, um contendo apenas folhas e outro contendo folhas e caules. Foram feitos o cultivo de *C. albicans* em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) e foram inseridos quatro discos de papel filtro com o diâmetro de 7 mm, cada um deles separadamente embebidos com 2,5 µL dos seguintes produtos: Fluconazol (150 mg) diluído em água, álcool de cereais, extrato com folhas, extrato com folhas e caules. Foi possível observar que os discos que continham extrato de planta apresentavam halos de diâmetro igual ou superior a 10 mm semelhante ao Fluconazol. Este resultado sugere que a Beldroega pode ser utilizada como forma de tratamento alternativo à candidíase, por ser uma forma natural de combater este problema de saúde com resultados semelhantes ao antifúngico sintético de escolha testado *in vitro*. Através desta atividade prática os alunos poderão aprender diferentes funções dos vegetais, inclusive suas propriedades medicinais, observar o crescimento de microrganismos e entender um dos procedimentos utilizados pela indústria farmacêutica na produção e seleção de medicamentos.

**Palavras chave:** Conhecimento popular, Plantas Medicinais, Microbiologia, Saúde, Aulas práticas.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 161**

### **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE COMPOSTOS NATURAIS CONTRA *CANDIDA* spp. E *CRYPTOCOCCUS* spp.**

Roberta Oliveira Viana<sup>1</sup>, Viviane de Souza Alves<sup>1</sup>, Rafael César Gonçalves Pereira<sup>2</sup>, Lucienir Pains Duarte<sup>2</sup>

<sup>1</sup>LBCM, Departamento de Microbiologia Universidade Federal de Minas Gerais 2Neplam, Departamento de Química da Universidade Federal de Mina Gerais

A escassez de novos fármacos disponíveis para tratar infecções fúngicas é preocupante devido ao surgimento de espécies resistentes aos antifúngicos em uso na clínica. Considerando este fato, vários estudos têm sido desenvolvidos para a identificação e avaliação de novos métodos terapêuticos e assim fazem-se necessário estudos aprofundados sobre a atividade antimicrobiana destes novos compostos bioativos. Este trabalho tem como objetivo avaliar a atividade de compostos triterpenos pentaciclicos contra seis espécies do complexo *Candida*: *C. albicans* ATCC5314, *C. albicans* ATCC18804, *C. glabrata* ATCC90030, *C. krusei* ATCC20298, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* ATCC750 e duas espécies de *Cryptococcus*: *C. gatti* L27 e *C. neoformans* H99. Foi avaliado o potencial antifúngico de compostos naturais isolados de *Maytenus* sp., Tingonona e Pristimerina (4µL/mL), utilizando o ensaio de viabilidade celular pelo teste do MTT, seguido por determinação de UFC/ mL pós exposição aos compostos, para determinação de ação fungicida ou fungistática utilizando a abordagem proposta, visando a posterior avaliação da eficácia dos compostos *in vivo* no modelo alternativo *Caenorhabditis elegans*, verificou-se que os pritimerina e tingonona não apresentam ação fungicida ou fungistática contra *C. albicans* ATCC5314, *C. albicans* ATCC18804, *C. krusei* ATCC20298 e *C. tropicalis* ATCC750, entretanto para *C. glabrata* ATCC90030 e *C. parapsilosis* foi observada diminuição da viabilidade celular quando comparada ao teste controle e neste caso TNG e PRI tiveram ação fungistática. Nas análises utilizando *Cryptococcus* sp., observou-se uma diminuição de viabilidade celular mais significativa que aquela observada para *Candida* spp., que representou ação fungicida dos compostos testados, já que houve crescimento das leveduras em BHI ágar. Este trabalho demonstrou até o momento que Tingonona e Pristimerina apresentam atividade antifúngica *in vitro*, sendo assim candidatos para testes de atividade *in vivo* em *C. elegans*.

**Palavras-chave:** *Candida*, *Cryptococcus*, antifúngicos

**Financiamento:** Capes e Cnpq



## RESUMOS

Número: 162

### ANTICORPOS NEUTRALIZANTES ANTI-ORTHOPOXVIRUS EM INDIVÍDUOS NÃO VACINADOS DE UMA POPULAÇÃO URBANA DO ESTADO DE MINAS GERAIS, BRASIL.

Jaqueleine Silva de Oliveira<sup>1</sup>; Galileu Barbosa Costa<sup>1,2</sup>; Poliana de Oliveira Figueiredo<sup>1</sup>, Carolina Dourado Amaral<sup>1</sup>, Ana Gabriella Stoffella Dutra<sup>1</sup>, Ana Teresa Saraiva Silva<sup>1</sup>, Betânia Paiva Drumond<sup>1</sup>, Jônatas Santos Abrahão<sup>1</sup>, Erna Geessien Kroon<sup>1</sup>, Giliane de Souza Trindade<sup>1</sup>.

1 – Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. E-mail: jaquelinebmedica@hotmail.com.

2 – Poxvirus and Rabies Branch, Division of High-Consequence Pathogens and Pathology, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA.

*Orthopoxvirus* (OPV) são vírus emergentes com grande importância na medicina humana e veterinária, como o *Vaccinia virus* (VACV), que ganhou notoriedade durante a campanha mundial de vacinação contra a varíola, conduzida pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Após a erradicação da varíola em 1980, a vacinação em massa foi suspensa. No entanto, a partir da década de 90, VACV têm causado surtos de vaccínia bovina (VB) na América do Sul. A via clássica de transmissão do VACV consiste no contato direto entre ordenhadores e bovinos infectados, caracterizando a doença como uma zoonose ocupacional. Um estudo transversal foi conduzido em julho de 2015 no Serro, estado de Minas Gerais para avaliar evidência sorológica de exposição à OPV. Foi realizada entrevista, aplicando-se um questionário semi estruturado para coleta de dados demográficos e fatores de risco. Amostras de soro foram coletadas e testadas através de ELISA IgG e plaque reduction neutralization test (PRNT) para pesquisa de anti OPV. Além disso, foram considerados não vacinados, todos os indivíduos com idade <38 anos, nascidos após o final da campanha de vacinação em massa. Um total de 61 indivíduos participou do estudo. Mulheres representam 73.8% dos participantes. A maioria da população autodeclarou-se parda (n=41, 67.2%). Vinte participantes apresentaram anticorpos IgG, sendo a prevalência global de 32.8%. O fator de risco associado à presença de IgG foi a presença da marca vacinal (OR = 7,56; IC95% = 1,94 - 29,38), (p <0,001). A pesquisa de anticorpos neutralizantes revelou 22 indivíduos soropositivos (36%), correspondendo a vacinados (n=12, 54.6%) e não vacinados (n=10, 45.4%). A presença de anticorpos neutralizantes em indivíduos não vacinados e residentes da área urbana, portanto não praticantes de ordenha, sugere a existência de rotas alternativas de transmissão do VACV. Fazendo-se necessária a investigação dessas possíveis rotas e do papel exercido pela mesma no ciclo epidemiológico da VB.

**Apoio Financeiro:** CAPES, CNPq e FAPEMIG.

**Palavras-chave:** Anticorpos neutralizantes, *Vaccinia virus*, rotas alternativas de transmissão, epidemiologia.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 163**

### **BRADYKININ B<sub>2</sub> RECEPTOR ACTIVATION INDUCES SEVERE DENGUE DISEASE VIA ENHANCEMENT OF VIRAL REPLICATION**

Victoria F. Queiroz<sup>1</sup>, Vivian V. Costa<sup>1,2</sup>, Caio T. Fagundes<sup>1,2</sup>, Flávio A. Amaral<sup>2</sup>, Deborah F. Valadão<sup>1,2</sup>, Lucas M. Kangussu<sup>3</sup>, Celso M. Q. Junior<sup>2</sup>, Jorge L. Pesquero<sup>4</sup>, Gustavo B. Menezes<sup>5</sup>, Daniela Bonaventura<sup>3</sup>, Mauro M. Teixeira<sup>2</sup>, Danielle G. Souza<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Interação Microrganismo-Hospedeiro, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil; <sup>2</sup>Imunofarmacologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil; <sup>3</sup>Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil; <sup>4</sup>Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil. <sup>5</sup>Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil; E-mail: [victoriafq18@gmail.com](mailto:victoriafq18@gmail.com)

**INTRODUCTION:** The aim of the study was to evaluate the role of Bradykinin (BK) receptors (B<sub>1</sub>R and B<sub>2</sub>R) in the development of severe Dengue. **METHODS/RESULTS:** BK receptors (B<sub>1</sub>R and B<sub>2</sub>R) expression was upregulated in liver and spleen of DENV-3-infected mice. DENV-3 infection of WT mice induced increased viremia, hepatic damage, hemoconcentration, thrombocytopenia and augmented vascular permeability. Moreover, infection resulted in a massive release of pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and CXCL-1. B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> mice exhibited increased survival rates when compared to WT and B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> mice. In accordance, the lack of B<sub>2</sub>R resulted in increased platelets level, prevented the increase of vascular permeability and the decrease of those pro-inflammatory cytokines. In addition the B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> mice presented lower viral loads in liver and blood when compared to WT infected mice. **CONCLUSION:** B<sub>2</sub>R activation is associated with increased dengue pathogenesis. Our data indicates that B<sub>2</sub>R activation contributes to increased inflammatory response and excessive viral replication. These results show that B<sub>2</sub>R activation contributes to dengue pathogenesis, given the induction of pro-inflammatory cytokines an exacerbating viral replication.

**Key Words:** *Dengue virus*, Bradykinin receptors, Pathogenesis

**Financial Support:** INCT-Dengue, CNPq, CAPES, and FAPEMIG.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 164**

**DETECÇÃO DE *Alphavirus* EM *Guaruba guarouba* DE CATIVEIRO EM BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS, BRASIL**

Silva, A. S. G.<sup>1</sup>, Queiroz, G. A.<sup>1</sup>, Rehfeld, I. S.<sup>1</sup>, Pinto, N. P.<sup>1</sup>, Medeiros, L. B.<sup>1</sup>, Mureb, E. N.<sup>1</sup>, Costa, E. A.<sup>1</sup>, Martins, N. R. S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, UFMG.  
E-mail: ailavet@yahoo.com.br

Os arbovírus (*arthropod-borne virus* - vírus transmitido por artrópodo) são mantidos em ciclos naturais através da transmissão contínua entre reservatórios vertebrados (aves e roedores) e mosquitos, sendo conhecido como o ciclo "mosquito-vertebrado-mosquito". Os mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Anopheles*, *Culiseta* e *Culex* infectados, podem transmitir o vírus para humanos e animais durante seu repasto sanguíneo. As infecções por arbovírus em aves selvagens estão associadas à encefalite não supurativa, podendo ocasionar em doença neurológica. No presente estudo, 46 psitacídeos nativos e exóticos cativos foram encaminhados ao Laboratório de Doenças das Aves (EV-UFMG), no período de 2015-2016 para diagnóstico da *causa mortis*. Todas as aves foram testadas paravírus do gênero *Alphavirus*. Alíquotas de 300 µL de tecido cerebral coletados durante a necropsia foram maceradas e o RNA total foi extraído utilizando-se o TRIzol®. Um total de 5 µL de RNA extraído foram usados para a síntese de cDNA com oligonucleotídeos randômicos e posterior reação de PCR *nested* com oligonucleotídeos degenerados gênero-específicos para detecção de *Alphavirus*. Como resultado, duas aves das espécies *Guaruba guarouba* foram positivas, com a amplificação de um fragmento de 195 pb. Em ambos os casos, não houve registro de doença clínica e uma das aves apresentou à necropsia lesão característica de síndrome da dilatação do proventrículo (PDD), sendo esta também positiva para *Bornavirus* aviário (avian *Bornavirus*-ABV) em RT-PCR. Os equinos são considerados sentinelas de expressão clínica para arbovírus, entretanto, os mesmos podem possuir uma infecção subclínica. Cavalos mantidos na propriedade de origem das aves positivas, não apresentaram sinais neurologicos na ocasião da morte dos psitacídeos. Portanto, sugere-se uma ampla investigação soroepidemiológica e/ou viral de aves e equinos da região afetada, com o objetivo de contribuir para o esclarecimento do padrão de circulação viral.

**Palavras chaves:** Psitacídeos, *Alphavirus*, arbovírus

**Apoio financeiro:** CAPES, CNPq, FAPEMIG.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 165**

### **AVALIAÇÃO DO ESTADO FÍSICO E NÚMERO DE CÓPIAS DO GÊNOMA DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO TIPO 16 UTILIZANDO UMA ABORDAGEM QUANTITATIVA DE PCR (QRT-PCR) REAL-TIME**

**SOUZA,V.B.P** <sup>1</sup>; de LIMA ROCHA, M.G <sup>2</sup>; AGUIAR,M.F.G <sup>1</sup>; TAFURI,A <sup>1</sup> ; FERNANDES, P.A <sup>1</sup> ; FERNANDES,A.P <sup>2</sup>; VAGO, A.R<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Laboratório de Patogênese Molecular, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas; <sup>2</sup> Departamento de Analises Clinicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais

**Introdução:** Milhares de mulheres em todo o mundo são infectadas pelo papilomavírus humano sendo o quarto câncer mais prevalente em todo o mundo. A infecção persistente por papilomavírus humano oncogênico (HPV) é o principal fator que propicia o desenvolvimento dos casos de câncer cervical. Mais de 95% dos tumorais cervicais são detectados a presença do DNA do HPV. Os tipos clássicos de HPVs de alto risco são o HPV-16 e HPV-18 sendo os mais prevalentes constituindo 50 e 14% do casos respectivamente. A integração do HPV-16 no genoma do hospedeiro foi sugerida como um fator associado à progressão neoplásica. **Objetivo:** O estudo tem como proposta avaliar o estado físico e o número de cópias do genoma do HPV-16. **Metodologia:** Foi utilizado um protocolo de PCR convencional em 39 amostras de tecidos com câcer cervical incluídas em parafina, a fim de identificar amostras positivas para HPV-16. Foi realizada uma PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR), para discriminar do estado físico do HPV-16 e determinar o número de cópias do genoma do HPV-16 no hospedeiro. **Resultados:** A partir do protocolo de PCR convencional o DNA do HPV 16 foi detectado em 94% (33/35) das amostras de câncer. **Conclusão:** O HPV 16 possui elevada prevalência, o estado físico do DNA do HPV juntamente com o número de cópias do genoma viral podem ser potenciais biomarcadores se melhores compreendidos.

**Palavras-chave:** infecção por HPV-16, câncer de colo do útero, estado físico do genoma HPV-16.

**Apoio Financeiro:** CNPq e FAPEMIG.



## **RESUMOS**

**Número: 166**

### **RETROSPECTIVE STUDY OF THE EPIDEMIOLOGICAL OF HANTAVIRUS CARDIOPULMONARY SYNDROME IN THE STATE OF MINAS GERAIS. PERIOD FROM 1998 TO 2014.**

Amaral, C.D<sup>1</sup>\*, Costa, G.B<sup>1</sup>, Oliveira J.S, Stoffella<sup>1</sup>, A, Oliveira<sup>1</sup>, P<sup>1</sup>, Abrahão, J.S<sup>1</sup>, Kroon E.G<sup>1</sup>, Drummond, B.P<sup>1</sup>, Oliveira, V.S<sup>2</sup>; Trindade, G.S<sup>1</sup>.

1. Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.
2. Unidade Técnica de Vigilância de Zoonoses da Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasília, Distrito Federal, Brasil.

\* email: carolinadamaral@gmail.com

Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome (SCPH) is the most serious manifestation of hantavirus infection in the Americas and it is characterized by severe pulmonary involvement that leads to respiratory failure. According to the Brazilian Ministry of Health, Southeast region accounted for 542/1995 cases, in which 287 (52.9%) were reported in Minas Gerais State (2017). This work describes a retrospective study of the cases of SCPH in Minas Gerais state for the period 1998 to 2014. We conducted a descriptive study of the records of the National Notifiable Diseases System (SINAN), analyzed the reporting data were evaluated for completeness of information, opportunity and profile of registered cases. 266 notifications occurred in 66 municipalities of the state, in which, Araxá, with 19,9% (53/266), Uberaba 11,2% (30/266), Patrocínio 10,9% (29/266), and Patos de Minas 10,5% (28/266) obtained the highest percentage of confirmed cases up to 2014. All municipalities with the highest reported disease are located in the Triângulo Mineiro. The average coefficient of lethality for the period was 36.8% (98/266). Deaths were more frequently in males 26.6% (71/266) however, a higher lethality coefficient was observed in female individuals 45% (27/60). Regarding seasonality, cases were observed in all months of the year, although, in the driest months a 62.4.3% (166/266) of notifications of the disease was observed. With the analysis of the data was possible to verify the need to prioritize actions aimed at surveillance programs epidemiology of hantavirosis in the state, given the high case-fatality rate presents this grievance. This study has demonstrated that this disease impacts the economically active population, mainly men who carry out rural activities. The results of this study may be used as auxiliar for technical skills, needed to be focused on the recognition of the circulation agent and has to be taken as context of alert for epidemiological surveillance of the state.

**Key words:** Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome, hantavirosis, ecoepidemiology.

**Financial support:** This study was supported by grants from the Ministério da Saúde, Brasil (TC335/2013) CNPq, FAPEMIG e CAPES.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 167**

### **PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE- $\gamma$ : A KEY MOLECULE DURING THE PATHOGENESIS OF *Dengue virus* INFECTION**

BAMBIRRA, J.L.<sup>1</sup>; MOREIRA, T. P.<sup>1</sup>; CAMARGOS, V. N.<sup>1</sup>; SOUSA, C. D. F.<sup>1</sup>; PASSOS, I. B. S.<sup>1</sup>; QUEIROZ-JÚNIOR, C. M.<sup>3</sup>; TEIXEIRA, M. M.<sup>2</sup>; COSTA, V. V.<sup>1,2</sup>; SOUZA, D. G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Interação Microrganismo-Hospedeiro – Departamento de Microbiologia – ICB/UFMG – Brazil; <sup>2</sup>Laboratório de Imunofarmacologia – Departamento de Bioquímica e Imunologia – ICB/UFMG – Brazil; <sup>3</sup>Departamento de Morfologia – ICB/UFMG – Brazil

Dengue is the most common arboviral disease that affects humans today and represents a serious public health concern. Several molecules and signaling pathways are involved in the pathogenesis of inflammatory diseases like dengue. PI3K $\gamma$ , a member of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway, has been a target of several studies because of its important activity during inflammatory conditions. The aim of this study was to evaluate the role of PI3K $\gamma$  activation in the pathogenesis of DENV-3 infection and to verify the therapeutic potential of the specific inhibitor of PI3K $\gamma$ , AS605240, against infection. Two different mouse models of DENV-3 infection were used. A lethal model induced by an adapted strain of DENV-3 and a “dengue fever” like model induced by a clinical isolate, in the presence or absence of pan-flavivirus antibody (4G2), which mimics secondary infection. Infection of wild type (WT) mice with the adapted strain resulted in PI3K $\gamma$  pathway activation, through AKT phosphorylation. Severe disease manifestation, as represented by massive thrombocytopenia, hemoconcentration, leucocyte recruitment and elevated viral loads to target organs, followed by lethality were observed after virus inoculation. PI3K $\gamma^{-/-}$  mice were massively protected from all DENV-3-induced parameters mentioned. In a model of mild disease using the clinical isolate, DENV-3 infected WT mice showed transient thrombocytopenia, hemoconcentration and increased vascular permeability at 24h after virus inoculation. Previous treatment of WT mice with 4G2 antibody exacerbated those manifestations. In this model, PI3K $\gamma^{-/-}$ , PI3K $^{kd/kd}$  and AS60524-treated mice were protected from primary and secondary disease manifestations induced by DENV-3. Indeed, viral loads recovered from supernatant of primary culture of peritoneal macrophages of PI3K $\gamma^{-/-}$  cells were reduced in comparison to WT littermates. Therefore, targeting PI3K $\gamma$  seems to be beneficial to prevent the major outcomes of DENV infection.

**Key Words:** Dengue, PI3K $\gamma$  and AS605240

**Financial support:** CNPq, FAPEMIG , CAPES and INCT em dengue.



## **RESUMOS**

**Número: 168**

### **IDENTIFICAÇÃO E TESTE DE EPÍTOPOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE SOROLÓGICO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL PARA ZIKA E DENGUE**

Colombarolli, S. G.<sup>1</sup>; Oliveira, E. S.<sup>1</sup>; Resende, D. M.<sup>2</sup>; Ruiz, J. C.<sup>2</sup>; Nakagima, R.<sup>3</sup>; Felgner, P.<sup>3</sup>; Assis, R. R.<sup>1</sup>; Calzava-Silva, C. E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Imunologia Celular e Molecular, <sup>2</sup>Informática de Biossistemas, Instituto René Rachou, Fiocruz Minas, Belo Horizonte, MG, Brasil. <sup>3</sup>Protein Microarray Laboratory, University of California, Irvine, Califórnia, Estados Unidos. E-mail: [stella.colombarolli@cpqrr.fiocruz.br](mailto:stella.colombarolli@cpqrr.fiocruz.br)

A zika é uma arbovirose causada pelo ZIKV, gênero *Flavivirus*. A infecção por ZIKV está relacionada com complicações neurológicas graves, como a microcefalia e danos no SNC em recém-nascidos, que acontecem através da transmissão vertical da gestante com o feto. Este fato, aliado a co-circulação de outros arbovírus e a dificuldade de diferenciar infecções baseada em sintomas clínicos, especialmente nos momentos iniciais da doença reflete a necessidade de se desenvolver um teste diagnóstico diferencial específico para a zika. A proposta deste projeto é a obtenção de um teste sorológico *point of care* sensível e específico. Para isso, foi feito o *download* de sequências sul-americanas e africanas do ZIKV, e as sequências de referência do DENV 1, 2, 3 e 4. Utilizando o preditor de epítópos para células B, foram identificadas 37 regiões para ZIKV e 37 correspondentes para a sequência polivalente de DENV. No intuito de identificar epítópos que pudessem ser reconhecidos unicamente por soros de pacientes infectados por ZIKV, foi feita uma análise *in silico* comparativa entre a composição destes epítópos em relação aos seus aminoácidos e as suas propriedades bioquímicas, além de estudos conformacionais. Foram selecionados 20 epítópos potencialmente capazes de serem reconhecidos apenas por soro de pacientes infectados pelo ZIKV. Esses epítópos foram base para a construção de 20 peptídeos, que foram comercialmente sintetizados e utilizados em experimentos de microarranjo proteico utilizando 16 amostras de soros de pacientes infectados pelo ZIKV ou pelo DENV, além de 5 soros de voluntários saudáveis. Até o momento 2 epítópos (ENV e NS2-B) apresentaram reconhecimento específico e deverão ser otimizados e resubmetidos a um novo microarranjo com grupos de amostras ampliados. A validação destes peptídeos será feita por técnicas sorológicas convencionais, e se assertivo, serão desenvolvidas *imunostrips* para a composição de um teste diagnóstico diferencial para zika e dengue.

**Palavras chave:** Zika virus, diagnóstico diferencial, diagnóstico sorológico, predição de epítópos, microarranjo

**Apoio financeiro:** CNPq, CAPES e PAPES/FIOCRUZ.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 169**

### **OCORRÊNCIA DE *Avipoxvirus* EM PERU DOMÉSTICO (*Meleagris gallopavo*)**

Costa, C. S.<sup>1</sup>; Coelho, H. L.G.<sup>1</sup>; Pinto, P. N.<sup>2</sup>; Mureb, E. M.<sup>2</sup>; Medeiros, L. B.<sup>2</sup>; Bretz, B. A. M.<sup>3</sup>; Batista, T. G. S<sup>3</sup>; Buiatte, A. B. G.<sup>4</sup>; Marín-Gómez, S. Y.<sup>5</sup>; Martins, N. R. S.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Graduanda em Medicina Veterinária da Escola de Veterinária da UFMG; <sup>2</sup>Programa de Residência Integrada em Medicina Veterinária da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais; <sup>3</sup> Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais; <sup>4</sup> Programa de Residência Uniprofissional em Medicina Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia; <sup>5</sup>Prof. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG. E-mail: [camilasiqueiracosta@gmail.com](mailto:camilasiqueiracosta@gmail.com)

A bouba aviária está entre as mais comuns doenças aviárias, conhecida popularmente como pipoca ou caroço, é causada por *Avipoxvirus* e se caracteriza, em gravidade crescente, pelas formas cutânea, diftérica e septicêmica. As lesões proliferativas e de coloração escura, ocorrem especialmente na pele exposta (crista, barbela, pés, etc.) à hematofagia por dípteros. O diagnóstico presuntivo pode ser embasado nos sinais clínicos, lesões e citologia. As aves doentes apresentam febre, tristeza, penas arrepiadas e epiteliomas (nódulos ou verrugas) nas regiões afetadas. O diagnóstico definitivo pode ser obtido pelo isolamento viral, PCR, demonstração histológica dos corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos eosinofílicos (de Bollinger) nas células epiteliais ou visualização viral em microscopia eletrônica. O presente trabalho tem o objetivo de registrar a ocorrência de lesões de bouba associada a *Avipoxvirus* em perus domésticos (*Meleagris gallopavo*). Perus jovens foram mantidos no laboratório para doação de sangue. No período foram atendidos casos de bouba em galinhas e pombos, com grande infestação de mosquitos da família Culicidae (*Aedes*, *Anopheles*, *Culex* e *Culiseta*) envolvidos na transmissão. As lesões incluiram hiperplasia cutânea na crista, pálpebras, cabeça, pescoço e pés. Amostras de pele das lesões foram coletadas e armazenadas em formol salina tamponado 10% (histopatologia), ou congelada a -20 °C, para isolamento e caracterização viral. Para confirmação da etiologia, extraiu-se o DNA total das lesões de pele (sílica), e a região que codifica da proteína 4b do cerne viral foi amplificada por PCR, revelando o produto de massa molecular esperada de 578 pb. Confirma-se a ocorrência de *Avipoxvirus* de galináceos (Fowlpox) nos perus. Há pouca notificação de casos de bouba aviária em aves domésticas e silvestres e a avaliação molecular sistemática das estirpes *Avipoxvirus* no Brasil poderá auxiliar no estabelecimento de estratégias preventivas mais eficientes.

**Palavras chave:** Bouba Aviária, Culicidae

**Apoio Financeiro:** CAPES, CNPq, FAPEMIG.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 170**

### **ORGANOTYPIC PLATFORM TO STUDY ZIKA VIRUS-RELATED NEURODEGENERATION**

Jacobsen, M.E.<sup>1,2</sup>; Pimenta, R.N.<sup>3</sup>; Guimarães, L.M.V.<sup>1</sup>; Carvalho, K.R.A.<sup>4</sup>; Orfanó, A.S.<sup>3</sup>; Machado, A.M.V.<sup>4</sup>; Coimbra, R.S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Neurogenômica e Imunopatologia, Fiocruz Minas, Belo Horizonte, MG; <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG; <sup>3</sup>Entomologia Médica, Fiocruz Minas; <sup>4</sup>Imunologia de Doenças Virais, Fiocruz Minas.

Zika virus (ZIKV) is a mosquito-borne flavivirus transmitted by *Aedes* spp. ZIKV infection during pregnancy can lead to congenital microcephaly. Despite recent reports of ZIKV infection in the central nervous system (CNS) in children and adults, little is known about the incidence of this disease and the associated neurological sequelae. Previous studies using stem-cell derived post-mitotic neurons and progenitor cells proved that ZIKV has tropism for these cells. However, these culture systems do not reproduce the cell diversity and 3D organization of neurogenic brain regions. Organotypic cultures preserve tissue architecture and cell interconnections. After birth, brain neurogenesis is restricted to the subventricular zone and the hippocampal dentate gyrus. Hippocampi slices from infant rats can be maintained in organotypic culture for many weeks, allowing the study of biochemical, epigenetic, electrophysiological and kinetic parameters. Therefore, the aim of this project is to investigate long-term effects in hippocampal neurodegeneration and neurogenesis impairment induced by two Brazilian ZIKV strains (SPH and PE243). Hippocampi slices from 7-day old rats were stabilized for 14 days in organotypic culture before being infected with SPH or PE243 ZIKV. After infection, slices were cultured in a time series experimental design. At each time point, slices were immunohistochemically stained using anti-NeuN antibody and DAPI. Micrographs were captured using a confocal microscope and the average number of neurons per slice was determined using the program ImageJ. A remarkable decrease in the neuronal population was evident five days after infection with both ZIKV strains (median of neuron count per 0.135 square milimeters = 85, 19, and 18, for control, PE243, and SPH, respectively;  $P < 0.05$  for infected vs. control). Thus, organotypic culture of hippocampal slices is a suitable tool to study ZIKV-induced neurodegeneration in the CNS.

**Key words:** Zika virus, organotypic culture, hippocampus, neurodegeneration

**Financial support:** FIOCRUZ, FAPEMIG, CNPq



## **RESUMOS**

**Número: 171**

### **MENINGOENCEPHALITIS CAUSED BY FLAVIVIRUS: SITUATION OF MINAS GERAIS STATE.**

**Paula Eillanny Silva Marinho<sup>1</sup>; Ana Paula Correa Crispim<sup>1</sup>; Talitah Candiani<sup>2</sup>; Pedro Paulo Martins Alvarenga<sup>2</sup>; Fabrizia Cristina Santos Castro<sup>2</sup>; Isabela Bechler Machado<sup>2</sup>; Alice Martins Alvarenga<sup>2</sup>; Jaqueline Germano de Oliveira<sup>3</sup>, Danilo Bretas de Oliveira<sup>4</sup>, Erna Geessien Kroon<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais

<sup>2</sup>Hospital Infantil João Paulo II, FHEMIG, Minas Gerais

<sup>3</sup>Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Minas Gerais

<sup>4</sup>Faculdade de Medicina de Diamantina, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Minas Gerais, Brazil.

Email: ei\_lanny@hotmail.com

Meningoencephalitis is the clinical condition in simultaneous inflammation of the encephalon and meninges occurs. Viral meningoencephalitis is the main cause of central nervous system (CNS) infections in the world, and viruses as *Humanherpesvirus* (HHV) and enteroviruses (ENTV), as well as flaviviruses are the main cause of these infections. The aim of this work is to detect and characterize the flaviviruses in cerebrospinal fluid (CSF) of patients with CNS infections. We analyze 94 CSF samples from children of the Hospital Infantil João Paulo II between the years 2014 and 2016. All samples were tested for ENTV, HHV-1 and 2 and 3, *Chikungunya virus* and flaviviruses including DENV e *Zika virus* (ZIKV). From these, 15 samples (16%) were positive for DENV; 3 samples (3%) were positive for ENTV; 2 samples (2%) positive for HHV-1/2 and 1 sample (1%) positive for ZIKV. In two samples coinfection between ENTV and DENV was detected. The molecular diagnosis showed DENV-3 as the most prevalent among the dengue viruses with seven positive samples, followed by DENV-2 with four positive and DENV-1 with two positive samples. None sample was positive for DENV-4. We detected cases of double infection between DENV-1 and 3 and DENV- 2 and 3, and cases of triple infection among DENV-1, 2 and 3. The samples were sequenced and the sequences of DENV-1 grouped with genotype V, that was related with other viruses which circulated in Brazil, and three samples grouped with genotype II that has never been described in Brazil before. The sequences of DENV-2 grouped with Asian II, and only genotype American Asian have been described in this country. The DENV-3 sequences grouped with genotype I and III that previously has been described here. The sample positive for ZIKV was related with post viral Guillain Barré syndrome. The detection of the agents involved in CNS infection allow the clinical therapy decisions antibiotics interruption and epidemiological information.

**Financial support:** CAPES, CNPq and FAPEMIG.



## TRABALHOS SELECIONADOS PARA PÔSTER

03/10/2017 – 08:00

### ÁREA: AMBIENTAL

Número: 172

#### SELEÇÃO DE BACTÉRIAS RIZOSFÉRICAS DE MILHO EFICIENTES NA BIOSSOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO NATURAL DE ARAXÁ

Abreu, C.S.<sup>1</sup>; Batista, F.C.<sup>2</sup>; Oliveira, J.C.M.D.<sup>1</sup>; Boniek, D.<sup>1</sup>; Oliveira, C.A.<sup>3</sup>; Gomes, E.A.<sup>3</sup>; Lana, U.G.P.<sup>3</sup>; Santos, V.L.<sup>4</sup>; Stoianoff, M.A.R.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Micologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. <sup>2</sup>UNIFEMM, Sete Lagoas, MG. <sup>3</sup>Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. <sup>4</sup>Laboratório de Microbiologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. E-mail: crisiaabreu@gmail.com

Micro-organismos solubilizadores de fósforo (MSP) podem ser combinados com rochas fosfáticas (fosfato natural) para aumentar a eficiência de utilização dessas rochas de baixa solubilidade. O presente trabalho objetivou selecionar MSP rizosféricos de milho eficientes na solubilização de fosfato natural *in vitro*. Foram coletadas amostras de solo rizosférico de milho no estádio de floração. O experimento de laboratório foi conduzido utilizando-se delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições. Um total de 145 isolados foram inoculados em meio de cultura líquido contendo fosfato natural de Araxá como fonte exclusiva de P, durante 9 dias a 28°C ±2°C e agitação constante. O fósforo (P) solúvel foi determinado por colorimetria e o pH mensurado em água. Os resultados foram submetidos individualmente à análise de variância e, quando ocorreram diferenças significativas pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade utilizando-se o programa Sisvar 5.3 (Ferreira, 2010). A análise de correlação de Pearson foi realizada utilizando o programa R (R Development Core Team 2011). Todas as estirpes apresentaram eficiência de solubilização variando de 4,78 mg.L<sup>-1</sup> a 114,61 mg.L<sup>-1</sup> de P. Observou-se redução significativa ( $p \leq 0,05$ ) para os valores de pH entre as estirpes testadas e uma correlação de Pearson de -0,05 ( $p \leq 0,05$ ) entre a eficiência solubilizadora das estirpes e a acidificação do meio. Estes resultados já eram esperados, uma vez que um dos mecanismos desenvolvidos por MSP é liberar metabólitos capazes de acidificarem o meio de cultivo. A acidificação do meio pode ser a etapa inicial do processo de solubilização, podendo ser maximizada ou até mesmo permanecer estável de acordo com as características de cada micro-organismo. As estirpes avaliadas neste estudo podem ser selecionadas para testes futuros de inoculação em milho, visando a biossolubilização de rochas fosfáticas e aumento da disponibilidade de P para esta cultura.

**Palavras-chave:** fósforo, micro-organismos rizosféricos, fosfato de rocha, *Zea mays* L.

**Apoio financeiro:** CAPES, Embrapa Milho e Sorgo, UFMG, CNPq, FAPEMIG.



## **RESUMOS**

**Número: 173**

### **PREDIÇÕES GUIADAS POR GENÔMICA DO POTENCIAL DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL DE ISOLADOS DE *SERRATIA MARCESCENS* ENDOFÍTICOS DE MILHO (*Zea mays*)**

Silva, U.C.<sup>1</sup>; Silva, D. R. C da<sup>1</sup>; Leite, L. R.<sup>2</sup>; Felestrino, E. B.<sup>3</sup>; Moreira, L. M.<sup>3</sup>; Almeida-Júnior, N. F.<sup>4</sup>; Oliveira, C. A.<sup>5</sup>; Santos, V.L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG- ubiana.microb.ufmg@gmail.com, Belo Horizonte, MG

<sup>2</sup>Grupo de genômica e informática de biossistemas, Centro de Pesquisa René Rachou, Fiocruz, Belo Horizonte, MG.

<sup>3</sup>Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto.

<sup>4</sup>Departamento de Informática e Estatística, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande MS.

<sup>5</sup>Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

Os micro-organismos interagem com as plantas desempenhando funções que podem auxiliar no seu crescimento. Estes podem ser usados para o desenvolvimento de inoculantes que aumentem a produtividade e sustentabilidade de culturas de importância no cenário agrícola, como o milho. Neste estudo, analisamos o genoma de duas linhagens de *Serratia marcescens* endofíticas de milho (UFMG2112 e UFMG85) visando identificar genes relacionados ao estilo de vida endofítico, promoção do crescimento vegetal e comparar seus genomas aos de *Serratia* isoladas de diferentes ambientes. Os genomas foram sequenciados utilizando a plataforma Illumina MiSeq, montados com os programas A5 e CAP3 e anotados utilizando o Prokka e o Rast. Em análises filogenéticas baseadas em famílias gênicas, UFMG2112 agrupou com *S. marcescens* isoladas de plantas (RSC14 e B3R3), de biofilme de superfície abiótica (WW4), de inseto (Db11) e com um isolado da espécie *S. ureilytica* associada a fonte geotérmica. Já UFMG85 agrupou com 3 isolados clínicos (UNAM836, SM39 e CAV1492), com alto bootstrap. Anotações funcionais dos genes preditos nos isolados revelaram a presença de genes core para a solubilização, hidrólise e aquisição de fosfato, aquisição de ferro, produção do ácido indol acético (AIA), motilidade, adesão e formação de biofilme, produção de bacteriocinas, antibióticos e genes que conferem resistência ao estresse oxidativo nas plantas. Foram detectados ainda 3 profagos no genoma de UFMG85 e 2 no genoma de UFMG2112, e CRISPR. Análises comparativas dos genomas mostrou a presença de regiões únicas, a maioria correspondentes a ilhas genômicas. Em UFMG2112, elas continham genes do sistema secretório tipo III, lipoproteína, protease e quitinase, enquanto em UFMG85, sistema secretório tipo IV, genes relacionados a conjugação e transposição, quimiotaxia e produção de raminolipídeo. O repertório de genes detectados confirma o estilo endofítico dos isolados e o potencial de promover o crescimento de plantas.

**Palavras-chave:** genômica, endofítico, *Serratia marcescens*, milho

**Apoio Financeiro:** Fapemig, CNPq, Embrapa e Capes



## RESUMOS

Número: 174

### QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIADAS ÀS FOLHAS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.)

Reis, M. A.<sup>1</sup>; Rozo, F. A. M.<sup>2</sup>; Silveira, K. C.<sup>2</sup>; Baldotto, M. A.<sup>3</sup>; Baldotto, L. E. B.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Estudante, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Viçosa, Avenida Peter Henry Rolfs, CEP 36570-000, Viçosa, MG. <sup>2</sup>Estudante, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Viçosa, *Campus Florestal*, Rodovia LMG 818, Km 06, CEP 35690-000, Florestal, MG. <sup>3</sup>Professor, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Viçosa, *Campus Florestal*, Rodovia LMG 818, Km 06, CEP 35690-000, Florestal, MG. <sup>3</sup>Professora, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Viçosa, *Campus Florestal*, Rodovia LMG 818, Km 06, CEP 35690-000, Florestal, MG. E-mail: [mairlaangelina20@gmail.com](mailto:mairlaangelina20@gmail.com)

O café (*Coffea arabica* L.) é uma espécie da família Rubiaceae. No Estado de Minas Gerais ocorre à produção significativa de *Coffea arabica* L., produzindo até o momento 35 milhões de sacas em 2017. A cultura do café para obter bons resultados de produção, necessita de doses altas de nitrogênio. Devido o uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados vem causando degradação ao meio ambiente, ocasionando outros problemas como lixiviação, volatilização e desnitrificação. Dessa forma os microrganismos vêm sendo utilizados gradativamente na agricultura, possuem diversas finalidades principalmente em minimizar os fertilizantes químicos. Assim uma das principais associações entre microrganismos e plantas é a fixação biológica do nitrogênio realizado por bactérias diazotróficas. O objetivo deste trabalho foi quantificar bactérias diazotróficas associadas às folhas de café. As amostras de folhas do cafeiro foram coletadas na Fazenda Quebra Anzol, município de Serra do Salitre, MG. Localizada pelas coordenadas geográficas latitude 19°17'06.1" S, longitude de 46°39'20.9" W e altitude de aproximadamente 1.200 m. Foram acondicionadas e transportadas para o Setor de Floricultura da UFV-CAF para conduzir o experimento. A quantificação das bactérias diazotróficas em folhas de café foi realizada pela técnica do Número Mais Provável (NMP) usando os diferentes meios de cultura JMV, JMVL, JNFb e LGI, considerando crescimento positivo para três repetições por diluição consultando a tabela de McCrady. Os resultados obtidos sofreram transformação logarítmica e posteriormente às médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Considerando o uso dos meios semi-sólidos JMV, JMVL, JNFb, e LGI foi possível verificar que bactérias diazotróficas estão presentes nas folhas de café. Foi observada maior ocorrência de bactérias no meio JMV, seguido pelos meios JMVL, JNFb e LGI. Conclui que bactérias diazotróficas habitam naturalmente as folhas de café.

**Palavras chave:** Rubiaceae, fertilizantes nitrogenados, fixação biológica do nitrogênio, cafeiro.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 175**

### **MICROBIOMA DE ÁGUA DE CONSUMO DO MUNICÍPIO DE OURO PRETO, MINAS GERAIS, BRASIL**

Oliveira, A. G. G.<sup>1</sup>; Dias, M. F.<sup>2</sup>; Ferreira, J. F. G.<sup>1</sup>; Silva, C. P<sup>1</sup>; Lanna, M. C. S.<sup>3</sup>; Rodrigues, L. S.<sup>4</sup>; Fernandes, G. R.<sup>5</sup>; Nascimento, A. M. A.<sup>2</sup>; Magalhães, P. P.<sup>1</sup>; Farias, L. M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. <sup>2</sup>Laboratório de Genética de Microrganismos, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. <sup>3</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG. <sup>4</sup>, Laboratório de Saneamento, Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, MG. <sup>5</sup>Instituto René Rachou, Fiocruz Minas, Belo Horizonte, MG.

A abordagem metagenômica permitiu o acesso à diversidade genética de um determinado ambiente e o estudo de microrganismos não cultiváveis. A verificação da qualidade microbiológica da água, desde a sua fonte de captação até o consumo final, utilizando tal abordagem, possibilita a detecção de microrganismos além daqueles considerados indicadores, permitindo o conhecimento mais amplo da dinâmica microbiana característica daquele ambiente. Considerando a relevância do tema, o presente trabalho tem como objetivo determinar o perfil das comunidades de Bacteria e Archaea na água de abastecimento do município de Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil, proveniente de fontes superficiais e subterrâneas, desde a água bruta de captação até o consumo final, em período chuvoso e seco. As amostras coletadas foram filtradas (poro 0,22 µm) previamente à extração de DNA, que foi realizada, a partir dos filtros, com o auxílio de *kit* comercial. Foi empregado o sequenciamento da região V4 do rDNA 16S, pelo *Illumina Miseq*. As sequências geradas foram processadas e foram criadas OTUs com 97% de identidade taxonômica. O filo Proteobacteria, classe Betaproteobacteria, predominou nas fontes de água doce usadas para abastecimento, com exceção das águas subterrâneas, na seca, nas quais Firmicutes, classe Bacilli, esteve presente em abundância superior. O período não influenciou significativamente na diversidade das comunidades, mas, a riqueza da água subterrânea aumentou significativamente no período chuvoso. O tratamento da água alterou a estrutura da comunidade, observando-se predomínio da classe Bacilli. As análises físico-químicas mostraram a influência de metais pesados e outros parâmetros na comunidade. Gêneros potencialmente patogênicos foram detectados ao longo dos sistemas de abastecimento, com destaque para *Enterococcus* e *Bacillus*. Em conjunto, os dados contraindicam o consumo dessas águas e revelam a deficiência da qualidade dos sistemas de abastecimento público e alternativo.

**Palavras-chave:** Sequenciamento de nova geração, rDNA 16S, água doce, água de consumo.

**Apoio financeiro:** CAPES, FAPEMIG, CNPq e PRPq/UFMG.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 176**

### **ANALISE METAGENÔMICA DA COMUNIDADE DE BACTERIA E ARCHAEA DO ESGOTO BRUTO, DE REATORES UASB E DOS EFLUENTES DAS ETAPAS DE PÓS-TRATAMENTO DA ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ESGOTO - ARRUDAS, BELO HORIZONTE-MG**

Marquioli, D.D.F.<sup>1</sup>; Oliveira, A.G.G.<sup>1</sup>; Nascimento, A.M.A.<sup>2</sup>; Rodrigues, L.S.,<sup>3</sup>; Magalhães, P.P.<sup>1</sup>; Farias, L.M<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. <sup>2</sup>Laboratório de Genética de Microrganismos, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. <sup>3</sup>Laboratório de Saneamento, Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, MG. E-mail: [diegomarquioli@gmail.com](mailto:diegomarquioli@gmail.com)

A água, molécula essencial à vida, é captada para a utilização humana, principalmente de rios e lagos e, após seu uso, retorna poluída para os corpos hídricos receptores e se torna uma potencial fonte de transmissão de doenças. O aumento da geração de esgoto, principalmente nos centros urbanos, requer a implantação de sistemas que impeçam a disseminação de doenças. As estações de tratamento de esgoto (ETEs) aceleram a depuração do esgoto e os reatores UASB apresentam vantagens para as regiões tropicais. No entanto, ainda são necessários sistemas de pós-tratamento para que o efluente possa, com segurança, ser dirigido aos corpos hídricos receptores. O desconhecimento da dinâmica das comunidades de Bacteria e Archaea, responsáveis pelo metabolismo da matéria orgânica em reatores UASB e nas etapas de pós-tratamento, bem como possivelmente presentes como contaminantes no esgoto, motivou a realização desse estudo. Quarenta amostras de efluentes foram coletadas, em dois períodos sazonais, em pontos estratégicos dos sistemas de tratamento de esgoto em escala de demonstração da ETE Arrudas (BH/MG). Sequenciamento de nova geração da região V4 do rDNA 16S foi empregado e as sequências foram comparadas com o banco de dados Silva v.123, utilizando o programa Mothur. Após agrupamento em unidades taxonômicas operacionais, considerando 97% de similaridade genética, os dados foram processados no programa R. A abundância relativa de Archaea decresceu à medida que o efluente ascendeu nos reatores, enquanto Bacteria predominou nas comunidades analisadas. Proteobacteria (43%), Bacteroidetes (15%), Firmicutes (13%) e Euryarchaeota (6%) foram os filos mais abundantes. Entre os patógenos de transmissão fecal-oral, destacou-se *Arcobacter*. Resultados preocupantes relativos à eficiência dos sistemas de tratamento de esgoto avaliados foram obtidos.

**Palavras-chave:** reator UASB, metagenômica, sequenciamento de rDNA 16S, tratamento de esgoto.

**Apoio financeiro:** CAPES, FAPEMIG, CNPq e PRPq/UFMG.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 177**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE LEVEDURAS ASSOCIADAS A FLORES E FRUTOS DO CAMPUS UFV-FORESTAL**

Costa, M.C.S.; Cardoso, M.E.F.; Cardoso, G.F.; Souza, R.A.

Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Viçosa, *campus* UFV-Florestal, Florestal, MG. E-mail: [mayracsc@hotmail.com](mailto:mayracsc@hotmail.com)

Leveduras são fungos unicelulares, em geral de formato oval, que se reproduzem assexuadamente por brotamento. Possuem ampla distribuição na natureza, sendo frequentemente encontradas em ambientes ricos em açúcares. Algumas espécies possuem a capacidade de fermentar carboidratos mesmo na presença de oxigênio, o que permite sua utilização em processos industriais. Apesar de compor um grupo bem conhecido, apenas uma pequena fração das espécies existentes foi descrita. O objetivo deste trabalho foi isolar leveduras do *campus* UFV-Florestal e realizar sua caracterização morfológica. Amostras de flores e frutos foram coletadas de diferentes locais do *campus* e colocadas em tubos de ensaio contendo solução salina (0,85% p/v) esterilizada. Após a coleta, alíquotas de 0,1 mL foram plaqueadas em meio YPD com ampicilina e incubadas a 30 °C por 48 horas. As colônias de leveduras foram identificadas em microscópio óptico e repicadas em novas placas de Petri. Após o crescimento, as células foram novamente visualizadas ao microscópio em preparação a fresco com corante azul de metileno e fotografadas para determinação da morfologia. As fotomicrografias foram analisadas utilizando-se o software ImageJ. No total, foram obtidos 60 isolados de vários formatos: desde células esféricas e ovais, até alongadas. O diâmetro médio das células dos diferentes isolados variou de 2,0 a 7,0 µm. O crescimento das células em diversos açúcares, como pentoses, ainda será avaliado para determinar a sua possível utilização em processos biotecnológicos. Com este trabalho, foi possível isolar e caracterizar morfologicamente diferentes linhagens de leveduras. Além disso, possibilitou a criação de uma coleção de culturas de leveduras locais que será explorada em futuros estudos taxonômicos e biotecnológicos.

**Palavras-chave:** leveduras, biodiversidade, morfologia celular

**Apoio financeiro:** FAPEMIG



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 178**

**FUNGOS FILAMENTOSOS DA LAPA VERMELHA - MG**

SILVA, R.C.S.<sup>1</sup>; COSTA, F.L.B.<sup>1</sup>; ALVES, V.S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Biologia Celular de Microrganismos, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. E-mail: roberta2704@outlook.com

As cavernas caracterizam-se como ambientes de alta umidade relativa, ausência permanente de luz e alta estabilidade ambiental. São ecossistemas com uma biota particular, principalmente em suas zonas mais profundas., nos quais também estão presentes os micro-organismos. Nestes ambientes, os micro-organismos desempenham um importante papel ecológico, como na região da Lapa Vermelha (Pedro Leopoldo/MG). Essa região é formada por um conjunto de cavernas, sendo que na Lapa Vermelha IV foi escavado o crânio de Luzia, reconhecido como o mais antigo das Américas. A região apresenta grande potencial turístico e a elaboração de um plano de manejo pode viabilizar a visitação a esse patrimônio. Este trabalho tem como objetivo realizar o levantamento dos fungos cavernícolas das cavidades da Lapa Vermelha para subsidiar seu Plano de Manejo. Foram coletadas três amostras de solo de cada região (Entrada, penumbra e afótica quando existentes) em quatro cavidades (Lapa Vermelha I, IV, V e VII). Estas foram submetidas a diluições seriadas e as mesmas cultivadas em ágar Sabouraud a temperatura ambiente. Foram obtidas 116 colônias puras que foram utilizadas para as análises. Para identificação morfológica utilizou-se a técnica de microcultivo de Riddel. A observação da macromorfologia permitiu a identificação de 47 morfotipos e estes foram submetidos a extração de DNA Gnômico. Os ácidos nucleicos foram utilizados para amplificação da região ITS por meio de PCR, com vistas a identificação molecular. Utilizando esta abordagem foi possível até o momento amplificar o alvo de 20 dos 47 morfotipos. As análises do micro cultivo amplificação e sequenciamento de ITSSs. Estão em andamento para identificação de gêneros/espécies para obtenção do perfil de fungos cavernícolas da Lapa Vermelha.

**Palavras-chave:** Cavernas, Microrganismos, Lapa Vermelha

**Financiamento:** CAPES e MC Ambiental



## **RESUMOS**

**Número: 179**

### **INCIDÊNCIA DE AFLATOXINAS EM MILHO ARMAZENADO EM PROPRIEDADES FAMILIARES SITUADAS NA REGIÃO CENTRAL DE MINAS GERAIS**

Conceição, R.R.P.<sup>1</sup>, Queiroz, V.A.V.<sup>2</sup>, Stoianoff, M.A.R.<sup>1</sup>, Miguel, R.A.<sup>2</sup>, Berbert, P.A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Micologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. <sup>2</sup>EMBRAPA – Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. <sup>3</sup>Departamento de Produção Vegetal, UENF, Campos dos Goytacazes, RJ. E-mail: renataponts@gmail.com

Cultivado em diversas regiões do mundo, o milho é um cereal que se destaca pela importância na alimentação humana e animal. Condições inadequadas de plantio, colheita, transporte e armazenamento são alguns dos fatores que contribuem para o ataque de pragas e a disseminação de fungos toxigênicos que podem resultar na produção de micotoxinas. As micotoxinas são metabólitos secundários causadores de sérios danos à saúde humana e animal, além de promover grandes perdas econômicas, pois tornam os grãos impróprios para o consumo. Pequenos produtores rurais do estado de Minas Gerais adotam o armazenamento de milho em espigas, em paióis rústicos, que propiciam a contaminação por fungos que podem produzir micotoxinas. Este estudo avaliou a incidência de aflatoxinas em 44 amostras de milho coletadas durante dois anos consecutivos em 11 propriedades familiares situadas na região Central de Minas Gerais. O teor de aflatoxinas foi determinado em fluorímetro Vicam, após purificação em colunas de imunoafinidade Aflatest®, seguindo metodologia descrita no manual da Vicam®. Observou-se que 100% das amostras analisadas no primeiro ano encontravam-se contaminadas por aflatoxinas, com níveis variando de 2,5 a 21,5 µg kg<sup>-1</sup>, e média de 4,9 µg kg<sup>-1</sup>. No segundo ano da pesquisa observou-se incidência de aflatoxinas totais em 76% das amostras, ou seja, em 16 das 21 analisadas. Os níveis variaram entre 0 e 77,0 µg kg<sup>-1</sup>, com média de 6,15 µg kg<sup>-1</sup>. De todas as 44 amostras analisadas durante os dois anos de pesquisa, 39 (88,6%) apresentaram contaminação por aflatoxinas, sendo que apenas duas (4,5%) ultrapassaram o limite máximo tolerado para consumo (20 µg kg<sup>-1</sup>) estabelecido pela ANVISA. Embora em apenas duas amostras as concentrações de aflatoxinas estivessem acima do limite máximo, a elevada ocorrência de aflatoxinas merece atenção, pois a maioria dos produtores familiares utiliza esses grãos para consumo próprio e para alimentação de seus animais.

**Palavras-chave:** *Aspergillus* sp.; *Zea mays* L.; Micotoxinas;

**Apoio financeiro:** CNPq, Embrapa, Emater, Fapemig, UENF, UFMG.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 180**

### **ANÁLISE FILOGENÉTICA DE ENZIMAS DA VIA DE RNA DE INTERFERÊNCIA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DO GÊNERO TRICHODERMA**

Cunha,M.C.<sup>1</sup>; Silva,A.C.<sup>1</sup>; Martins,C. S. F.<sup>1</sup>; Tomé, L.M.R<sup>1</sup>; Fonseca,P.L.C.<sup>1</sup>; Góes-Neto, A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>. Laboratório de Biologia Molecular e Computacional de Fungos, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. <sup>3</sup>, Belo Horizonte, MG.

Email: [mayaracabral@ufmg.br](mailto:mayaracabral@ufmg.br)

O reino Fungi é um dos maiores e mais diversificado grupo de organismos. O gênero Trichoderma, mesmo sendo largamente utilizado nas indústrias alimentícias, têxteis e de agricultura, ainda possui poucos estudos sobre suas enzimas da via RNAi de interferência. Os mecanismos silenciadores mediados pela via de RNAi regulam a expressão gênica na transcrição e na pós-transcrição. Este tipo de silenciamento têm constituído uma ferramenta importante, pois além destes pequenos RNAs (sRNA) desempenham funções relacionadas ao sistema imune protegendo o genoma contra a ação de ácidos nucléicos invasores; podem também ser utilizados para determinação do genoma funcional. Em fungos, duas vias já foram descritas: a via *quelling* e a de silenciamento meticuloso e meiótico por vias de DNA não compensadas (MSUD). Ambos parecem ser mecanismos efetivos de defesa do genoma e operam em fases diferentes, uma durante o desenvolvimento assexuado (*quelling*) e a outra no sexuado (MSUD). O gênero *Trichoderma sp.* possui poucos estudos sobre a caracterização das vias de RNAi, por isso, o objetivo deste trabalho é caracterizar as enzimas Dicer, Polimerase e Argonauta. Para isso, foram obtidas sequências de referências destes genes de outros gêneros de fungos ascomicetos e plantas e comparadas com as sequências de *Trichoderma sp.*. Foi realizado o alinhamento com o programa MAFFT utilizando a interface com o software Geneious e feita a construção de árvores filogenéticas pelo método de distância (Neighbor-joining). Foi verificado que as sequências de Trichoderma eram mais próximas a via de MSUD. Porém, algumas sequências foram caracterizadas pertencendo a via de *Quelling*, via ativa na fase assexuada do fungo estudado. A partir das informações obtidas na análise filogenética, serão feitos pares de iniciadores específicos para quantificar o número de cópias expressas de cada gene estudado.

**Palavras-chave:** Fungos endofíticos, RNA de interferência, filogenia, enzimas RNAi

**Apoio Financeiro:** NSF, CAPES, CNPq



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 181**

### **PERFIL PROTÉICO DIFERENCIAL DE *Meyerozyma caribbica* INDUZIDO POR MANGANÊS**

Ruas, F. A. D.<sup>1</sup>; Guerra-Sá, R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

E-mail: [franceannedruas@yahoo.com.br](mailto:franceannedruas@yahoo.com.br)

A expressão protéica e sua modulação sofrem variações em adaptação às condições nutricionais e ambientais com mudanças no metabolismo energético, levando a adaptações fisiológicas. A espécie *Meyerozyma caribbica* em trabalhos anteriores do nosso laboratório apresentou uma excelente capacidade de remoção de íons manganês II ( $Mn^{2+}$ ), com grande potencial para uso em processos de biorremoção. Entretanto, os mecanismos moleculares e bioquímicos envolvidos nesse processo ainda são pouco compreendidos. Continuando essa investigação, o objetivo deste trabalho foi obter o primeiro perfil protéico solúvel total e diferencial de *M. caribbica*, obtido na ausência e presença de  $Mn^{2+}$ . Inicialmente *M. caribbica*, foi crescida em meio YPD na ausência e presença de 0,9mM de  $MnSO_4$ . O extrato solúvel foi quantificado pelo Método BCA e as amostras foram fracionadas em SDS-PAGE 10%, a seguir foram analisadas utilizando o software *Quantity One®*. Cerca de 50 $\mu$ g do extrato total foram utilizados para a focalização isoelétrica, utilizando strips *IPG buffer*, pH 3-10 de 7cm, seguido de: Reidratação por 14h, posteriormente; 300V-30min.; 1000V-30min.; 5000V-1:20h, seguida de eletroforese bidimensional (2-DE) e o gel foi corado com *Coomassie Blue* e as imagens foram capturadas no *ImageScanner III*. Os experimentos foram realizados em triplicatas. O perfil 2-DE das amostras crescidas na ausência dos íons  $Mn^{2+}$  permitiu identificar um número médio de 428 *spots* e quando na presença dos íons  $Mn^{2+}$ , foram identificados 311 *spots* e foi possível verificar poucos *spots* únicos nas amostras estudadas. Em relação à distribuição dos *spots* foi constatado que a maioria estavam no intervalo de *pI* entre 5 a 9 e na faixa de massa molecular entre 18,8 a 101,4 kDa. Em conjunto, os resultados permitem concluir que a presença de 0,91mM de  $Mn^{2+}$  induz poucas alterações no proteoma solúvel de *M. caribbica*. Os próximos experimentos estão direcionados para a identificação dessas proteínas por Espectrometria de Massas.

**Palavras chaves:** Expressão protéica, SDS-PAGE, Eletroforese bidimensional, spots

**Apoio financeiro:** CAPES, UFOP, CNPq



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 182**

### **PADRONIZAÇÃO DE PCR CONVENCIONAL PARA PROSPECÇÃO DE *Orthobunyavirus* DO GRUPO C EM COLEÇÕES DE PEQUENOS MAMÍFEROS DO ESTADO DE MINAS GERAIS**

Saraiva-Silva, A.T.<sup>1</sup>; Figueiredo, P.O<sup>1</sup>; Oliveira, D.B.<sup>1,2</sup>; Fonseca, P. L. C.<sup>1</sup>; Lima, M. T.<sup>1</sup>; Bonjardim, C.A.<sup>1</sup>; Ferreira, P.C.P.<sup>1</sup>; Drumond, B.P.<sup>1</sup>; Abrahão, J.S<sup>1</sup>; Kroon, E.G.<sup>1</sup>; Trindade, G.S.<sup>1</sup>;

<sup>1</sup>Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos, 6627, Campus Pampulha, CEP: 31270-901. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Fax number: +55-31-3443-6482. E-mail: [anateresasaraivasilva@gmail.com](mailto:anateresasaraivasilva@gmail.com)

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina de Diamantina, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e do Mucuri - Campus JK. Rodovia MGT 367 - KM 583, N° 5000 Bairro Alto da Jacuba, CEP 39.100-000, Diamantina, Minas Gerais, Brasil.

O sorogrupo C do gênero *Orthobunyavirus*, pertence à família *Bunyaviridae*, que comprehende vírus envelopados com genoma de RNA tri-segmentado, sendo composto por 15 vírus, dos quais 4 são reconhecidos como espécies e os demais como amostras destas. Estes arbovírus estão associados a doenças febris, artralgia febril, encefalites e, em algumas situações, febres hemorrágicas em humanos, principalmente aqueles com histórico de trânsito por áreas de mata fechada. No Brasil, a região amazônica apresenta maior incidência de casos em humanos, mas já foram isolados vírus advindos de regiões de matas em São Paulo e em outras regiões do país. Os isolados são provenientes de pacientes com doença febril, animais sentinelas e animais silvestres, como aves e mamíferos, e artrópodes, todos envolvidos em seu ciclo replicativo, que apresentam infecções inaparentes e podem atuar como agentes amplificadores e disseminadores dos vírus através de migração. Sabendo-se que estes agentes virais podem estar associados a roedores silvestres, que apresentam grande relevância para a saúde pública, o objetivo desse trabalho é a padronização de PCR convencional *semi-nested*, para detecção de *Orthobunyavirus* em amostras de soro e vísceras de pequenos mamíferos, coletados entre os anos de 2011 a 2013 em regiões urbanas, rurais e silvestres de Sabará, Serro, Rio Pomba, Ouro Preto e Contagem. Para tal, os iniciadores foram construídos utilizando amostras de referência dos *Orthobunyavirus* brasileiros Caraparu, Apeu e Itaya, tendo como alvo o segmento L, codificador da polimerase, e serão usados para detecção e inferências filogenéticas. Para a padronização da reação foi utilizado cDNA de amostras dos vírus Caraparu e Apeu. Os parâmetros testados foram temperatura e concentração de reagentes, que após procedimento em eletroforese resultaram na amplificação de fragmentos de aproximadamente 416pb. Os produtos da reação foram sequenciados, confirmando a especificidade dos iniciadores e da reação de PCR.

**Palavras chave:** Orthobunyavirus, roedores, detecção molecular

**Instituições financiadoras:** CNPq, FAPEMIG, CAPES



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 183**

**ANALISE COMPARATIVA DO CICLO DE MULTIPLICAÇÃO DAS DIFERENTES LINHAGENS DE MARSEILLEVÍRUS**

Arantes, T.S.<sup>1</sup>; Oliveira, G. P.<sup>1</sup>; Silva, L.K.S.S.<sup>1</sup>; Dornas, F.P.<sup>1</sup>; Abrahão, J.S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais. E-mail: tsarantes@gmail.com

Os vírus gigantes de amebas tem despertado amplo interesse desde a descoberta do *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* em 2003. Os estudos de prospecção tem permitido o conhecimento de novos vírus como, por exemplo, os vírus pertencentes à família *Marseilleviridae*. Estes vírus já foram isolados de ambientes aquáticos, solo, insetos e amostras humanas. Atualmente, os marseillevírus são divididos em linhagens A, B, C e D. Este trabalho tem como objetivo caracterizar o ciclo de multiplicação dos marseillevírus. Para isso, células de *A. castellanii* foram infectadas com *Marseillevirus marseillevírus* (MsV), (linhagem A), Lausennevírus, (linhagem B), Tunis vírus, (linhagem C) e Brazilian Marseillevírus (BrMsV), (linhagem D), na MOI de 0,01 e submetidas a microscopia eletrônica de transmissão (MET). Além disso, foi realizada uma titulação viral para avaliar a formação de vesículas e a eficiência de infecção das mesmas, quando comparada às partículas virais fora de vesículas. Por fim, foram identificados genes associados ao metabolismo de lipídeos possivelmente relacionados a formação das vesículas. As imagens de MET revelaram que ambas as linhagens de marseillevírus penetram nas amebas por diferentes vias: fagocitose de vesículas gigantes, endocitose de partículas individuais e fagocitose de partículas agrupadas. A presença de vesículas gigantes foi observada em todas as linhagens. No entanto, as vesículas formadas pelo BrMsV são menores e menos frequentes. Curiosamente, observamos que o Tunis vírus apresenta uma morfogênese diferenciada, uma vez que as partículas virais se apresentam em forma de colmeias dentro das fábricas virais. A análise dos genes relacionados a metabolismo de lipídeos demonstra uma ampla divergência entre as linhagens, sendo o Tunis o mais divergente. Os dados obtidos neste trabalho descrevem as principais características do ciclo de multiplicação dos marseillevírus, ressaltando a importância do isolamento e caracterização de novos vírus gigantes.

**Palavras chaves:** Marseillevírus, vesículas, vias de penetração.

**Apoio Financeiro:** Capes, CNPq, FAPEMIG.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 184**

### **PRESENÇA DE ELEMENTOS MÓVEIS EM FUNGOS DAS ESPÉCIES *Trichoderma harzianum***

**Fonseca, P.L.C.<sup>1</sup>; Cunha, M.C.<sup>1</sup>; Castro, A.<sup>1</sup>; Aguiar, E.R.G.R.<sup>2</sup>; Badotti, F.<sup>3</sup>; Vaz, A.B.M.<sup>1,5</sup>; Marques, J.T.<sup>2</sup>; Góes-Neto, A.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Química, Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET-MG), Belo Horizonte, MG, 30480-000, Brasil. <sup>4</sup>LANAGRO/MG – Laboratório Nacional da Agricultura, Ministério da Agricultura, (MAPA), Pedro Leopoldo, MG, 33600-000, Brasil <sup>5</sup>Faculdade de Minas (FAMINAS), Belo Horizonte, MG, 31744-007, Brasil. **Email:** camargos.paulaluize@gmail.com

O gênero *Trichoderma* sp. é encontrado como fungos simbiontes, sapróbios e micoparasitas, podendo apresentar transições em seu ciclo de vida. Várias espécies apresentam grande interesse econômico na indústria agrícola. Um exemplo é a espécie *Trichoderma harzianum*, que além de ser encontrado como micoparasita, também pode ser encontrado como endofítico, como ocorre na planta *Hevea brasiliensis*. Apesar do interesse comercial, poucos são os trabalhos de biologia do fungo que tenham como finalidade o estudo das vias reguladoras. Por isso, o objetivo deste trabalho é caracterizar a via de RNA de interferencia (RNAi) em *T. harzianum* isolados de *H. brasiliensis*. Para isso, foram selecionados quatro isolados previamente identificados, que tiveram o RNA total extraído e os pequenos RNAs (sRNAs) foram sequenciados no equipamento HiSeq (illumina). As sequências provenientes foram submetidas a um filtro de qualidade e as remanescentes foram usadas para a montagem de *contigs*. Ao final do processo, foi possível montar *contigs* que não possuíam similaridade com sequências disponíveis nos bancos de dados públicos. Para esses *contigs*, foi verificado o perfil de distribuição dos sRNAs, e foi observado que o perfil é similar com a presença de elementos móveis (EM). Para verificar, a localização dos *contigs* montados, foi feito o seu mapeamento contra o genoma de referencia de *T. harzianum*, e foi observado que estes estavam presentes no genoma mitocondrial do fungo. Este trabalho permitiu a detecção de EM no genoma mitocondrial de *T. harzianum* e pode ser útil para o estudo de integração de EM no genoma fúngico. Este resultado levou ao questionamento da presença desses EM em uma região considerada conservada e de grande importância para o crescimento do fungo, e por isso, será feito o nocauteamento de genes específicos para confirmar a presença dos EM e estudar o papel da via de RNAi em fungos.

**Palavras chave:** *Trichoderma harzianum*, pequenos RNAs, elementos móveis, genoma mitocondrial.

**Apoio Financeiro:** NSF, CNPq



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 185**

### **OCORRÊNCIA, ABUNDÂNCIA E ORIGEM DE GENES ASSOCIADOS A VIAS DE TRADUÇÃO PROTÉICA EM VÍRUS GIGANTES**

**SILVA, L.C.F.<sup>1,2</sup>; RODRIGUES, R.A.<sup>1</sup>; ASSIS, F.L.<sup>1</sup>; SANTOS SILVA, L.K.<sup>1</sup>; ARANTES, T.S.<sup>1</sup>; BORATTO, P.V.M.<sup>1</sup>; KROON, E.G.<sup>1</sup>; LA SCOLA, B.<sup>2</sup>; ABRAHÃO, J.S.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. E-mail: lorena.farmacia@yahoo.com.br

<sup>2</sup>URMITE CNRS UMR 6236 – IRD 3R198, Aix Marseille Universite, Marseille, France  
Acanthamoeba polyphaga mimivirus (APMV) apresenta genes relacionados com processo de tradução protéica. Tais genes nunca haviam sido observados em outros vírus na ocasião da descoberta, sendo considerados exclusivos de organismos celulares. Atualmente, sabe-se que outros isolados de vírus gigantes genes deste tipo. Assim, este estudo teve o objetivo de prospectar e caracterizar elementos envolvidos em tradução em diferentes vírus gigantes. Para isso, os genomas de mimivírus das linhagens A, B e C; *Cafeteria roenbergensisvirus*, *Klosneuvirus*, *Acanthamoebacastellanii*, *Encephalitozoonuniculi*, *Nanoarchaeumequitans* e *CandidatusCarsonellarudivi* foram analisados quanto a presença de RNA transportadores (tRNA), aminoacil-tRNAsintetasas (aaRS) e outros fatores envolvidos em biossíntese proteica. A partir da formação deste banco de dados, foram feitas análises de redes utilizando o programa Gephi 0.91.1; foi calculado o uso códon/aminoácidos utilizando o programa Artemis e foram feitas análises filogenéticas para as sequências de aminoácidos de aaRS através do programa MEGA 7.0. A comparação entre os genes relacionados à tradução mostrou que o grupo dos Klosneuvirus apresenta um maior conjunto de tRNA em relação aos demais, além de apresentar aaRS para 20 aminoácidos conhecidos, assim como visto para *A. castellanii* e *E. cuniculi*, sendo que as análises filogenéticas destas aaRS evidenciou uma origem independente de organismos celulares. Em relação a outros fatores envolvidos com tradução, os vírus gigantes e pequenos organismos celulares apresentaram um conjunto menor em relação à *A. castellanii*. A análise de uso de códons/aminoácidos para estes vírus *A. castellanii*, revelou um perfil de uso semelhante entre os vírus, enquanto difere do uso pela célula hospedeira. Concluindo, os dados aqui apresentados contribuem para uma melhor compreensão acerca da abundância, diversidade e origem de genes associados à tradução em vírus gigantes.

**Palavras chave:** Vírus gigantes. RNA transportadores. Aminoacil-tRNAsintetasas. Tradução.

**Apoio Financeiro:** CAPES, CNPq, FAPEMIG; MAPA.



## **ÁREA: BIOTECNOLOGIA**

**Número: 186**

### **CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE UM PLASMÍDEO TERAPEUTICO PARA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA HSP65 DE *Mycobacterium leprae* EM CÉLULAS MAMIFERAS UTILIZANDO UMA LINHAGEM DE BACTERIA LACTICA COMO VEÍCULO CARREADOR**

**Batista, V.L.<sup>1</sup>; Rocha, N.D.C<sup>1</sup>; de Jesus, L.C.L. <sup>1</sup>; Prosperi, C.C.<sup>1</sup>; Mancha Agresti, P.<sup>1</sup>; Drummond, M.M.<sup>1</sup>; Azevedo, V<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup> Laboratório de Genética Celular e Molecular, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. E-mail: viviane.lima.batista@hotmail.com.

As bactérias lácticas são muito bem caracterizadas na literatura e vêm sendo muito utilizadas nas indústrias alimentícia, farmacêutica e como ferramentas biotecnológicas de comprovada eficácia. Dentre elas, *Lactococcus lactis* é considerada a bactéria modelo, sendo classificada como segura pelo FDA (*Food and Drug Administration*). Diversas proteínas imunogênicas e imunomoduladoras já foram produzidas utilizando esse micro-organismo. Recentemente, *L. lactis* tem sido considerado para atuar como veículo de entrega de vacinas de DNA. Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa desenvolveu o plasmídeo vacinal pExu, carreado por *L. lactis*, cuja funcionalidade foi confirmada em modelos *in vivo* e *in vitro*. Assim, acreditamos que a utilização de *L. lactis* contendo o vetor pExu para a expressão da proteína HSP65 de *Mycobacterium leprae* possa representar uma possibilidade terapêutica para doenças inflamatórias e autoimunes. Essa proteína, que possui atividade imunorregulatória, mostrou ser eficaz na prevenção de modelos de doenças inflamatórias crônicas, como a colite ulcerativa e a encefalomielite autoimune. Desta forma, este projeto teve como objetivo a construção e avaliação funcional do plasmídeo pExu:*hsp65*. Para isso, a sequência codificadora de HSP65, previamente inserida no plasmídeo pVAX1, foi isolada por digestão enzimática e purificada. O plasmídeo pExu também foi digerido e recebeu o inserto HSP65 por meio de reação de ligação. A construção final, pExu:*hsp65* foi obtida em *Escherichia coli* e posteriormente em *L. lactis* MG1363. Por fim, este plasmídeo teve sua funcionalidade confirmada por transfecção em células CHO (*Chinese Hamster Ovary*) e avaliação por microscopia confocal. Os resultados demonstraram a expressão da proteína HSP65 nas células transfetadas, evidenciando sua funcionalidade. Dessa forma, a construção do plasmídeo pEXU:*hsp65* abre perspectivas para continuidade do projeto, visando o tratamento de doenças autoimunes, como por exemplo a esclerose múltipla.

**Palavras chave:** *Lactococcus lactis*, vacinas de DNA, pExu, HSP65.

**Apoio financeiro:** CNPq, CAPES e FAPEMIG.



## **RESUMOS**

**Número: 187**

### **GENÔMICA COMPARATIVA DE *Xanthomonas* COMO FERRAMENTA PARA O DESENVOLVIMENTO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR A PARTIR DE GENES ESPÉCIE-ESPECÍFICOS**

Fonseca, N.P.<sup>1</sup>; Felestrino, E.B.<sup>1</sup>; Caneschi, W.L.<sup>1</sup>; Belasque Jr. J.<sup>3</sup>; Almeida, Jr. N. F.<sup>4</sup>; Moreira, L.M.<sup>1</sup> <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB), Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Campus Morro do Cruzeiro, Ouro Preto – Minas Gerais, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Biológicas (DECBI), Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Campus Morro do Cruzeiro, Ouro Preto – Minas Gerais, Brazil. <sup>3</sup>Departamento de Fitopatologia e Nematologia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ. <sup>4</sup>Instituto de Computação – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

O desenvolvimento da genômica comparativa e bioinformática possibilitaram a análise de similaridades e diferenças entre genomas. Neste contexto, o diagnóstico molecular emergiu como um recurso para a investigação da presença de patógenos específicos em hospedeiros compatíveis. A cancrose é uma grave doença que afeta a citicultura, causando prejuízos ao Brasil, maior exportador de laranja e suco concentrado do mundo. O aumento da ocorrência desta doença em plantas cítricas pode estar associado à presença de distintas subespécies do fitopatógeno *Xanthomonas* (A, B, C e CM), responsáveis pela redução na produção deste comodite. Diferentes níveis de virulência e ampla gama de hospedeiro de relevância comercial contribuem para a importância no controle da doença. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um *pipeline* computacional para identificação de genes espécie-espécíficos usados em diagnóstico molecular. Para análise e determinação das sequências únicas alvos das espécies foram utilizadas plataformas baseada nas ferramentas *OrthoMCL*, *MAUVE* e *Primer Designing* do *NCBI*. Para a seleção dos oligonucleotídeos espécie-espécífico foram consideradas as diferenças nos tamanhos dos amplicons para facilitar a análise visual do produto amplificado. As regiões alvo foram amplificadas por PCR e analisadas em gel de agarose 3%. Os resultados mostraram que os oligonucleotídeos selecionados amplificaram regiões específicas nos genomas alvo, sem qualquer amplificação cruzada nos outros genomas de referência, o que foi reforçado pelos resultados de PCR multiplex. Foram também feitas diluições progressivas do DNA alvo com amplificações positivas para concentrações de até 0,03ng/µL (~10<sup>5</sup> células). Todos os resultados encontrados não apenas validaram a ferramenta computacional desenvolvida para este fim, como também colocaram em evidência a primeira ferramenta empírica de diagnóstico da cancrose para as distintas espécies de *Xanthomonas* que acometem citros.

**Palavras chave:** diagnóstico molecular, genômica comparativa, bioinformática, *Xanthomonas*

**Apoio Financeiro:** CAPES



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 188**

### **EFICIÊNCIA DO SISTEMA CRISPR-CAS9 PARA A REVERSÃO DA RESISTÊNCIA A AMPICILINA**

Pereira, M.P.M<sup>1</sup>; Tagliaferri, T.L.<sup>1</sup>; Arantes, A.J.R.<sup>1</sup>; Vilela, L.F.F.<sup>2</sup>; Mendes, T.A.O.<sup>3</sup>; Santos, S.G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, Departamento de Microbiologia, <sup>2</sup>Laboratório de Biologia Sintética e Biomiméticos, Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG. <sup>3</sup>Laboratório de Biologia Sintética e Biologia de Sistemas, Departamento de Bioquímica, UFV.

As  $\beta$ -lactamases vêm sendo o principal mecanismo de resistência estudado na história das infecções bacterianas. A família de enzimas TEM está entre os fatores de resistência mais dispersos em micro-organismos. Considerando a disseminação desses genes e seu impacto na sociedade, pesquisas que abordem a redução de resistência em micro-organismos são necessárias. Para tanto, o sistema CRISPR-Cas9 pode ser uma alternativa viável para a edição de genes de resistência presente em micro-organismos de relevância clínica. De acordo com essa visão, esse estudo objetiva avaliar a relação entre células apresentando ou não o nocaute do gene codificador da enzima TEM em *Escherichia coli* a fim de aferir a eficiência desse sistema. O sistema CRISPR-Cas9 contendo o gRNA direcionado ao gene *blaTEM* foi transformado em linhagem de *E. coli* BL21 contendo um vetor carreando o gene alvo. Para observar a eficiência do sistema na edição do gene, todas as colônias transformadas foram cultivadas em meio LB com ampicilina. Ao todo, oito colônias editadas e não editadas foram selecionadas para a avaliação da curva de crescimento na presença e na ausência do antimicrobiano. Duzentas e seis colônias foram transformadas com o sistema CRISPR-Cas9. A eficiência mensurada inicialmente, avaliada pelo número de amostras que não cresceram em meio com ampicilina, foi de 13,59%. Entretanto, após a avaliação da curva de crescimento, 100% das amostras editadas e não editadas apresentaram o perfil de susceptibilidade a ampicilina, com ausência de crescimento, indicando que o valor encontrado inicialmente foi subestimado. Dessa forma, pode-se sugerir que a metodologia inicial de avaliação fenotípica pode não ter sido o método ideal para avaliação da edição. Outra possível hipótese é que o sistema CRISPR-Cas9 teve sua função retardada, considerando que após as primeiras 24 horas de transformação o fenótipo de resistência ainda se encontrava presente.

**Palavras-Chave:**  $\beta$ -lactamases, TEM, resistência em *Escherichia coli*, edição gênica, CRISPR-Cas9.

**Apoio Financeiro:** FAPEMIG; CAPES; CNPq; PRpq/UFMG.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 189**

### **EFEITO ANTAGONISTA DE BACTÉRIAS LÁTICAS DE GRÃOS DE KEFIR SOBRE *Staphylococcus aureus***

Bragança, K.P.<sup>1</sup>; Oliveira, R.B.P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte, MG. E-mail: [kellenpbraganca@gmail.com](mailto:kellenpbraganca@gmail.com)

Kefir é uma bebida definida como leite fermentado, através da adição de grãos de Kefir, contendo associação de leveduras, bactérias acéticas e bactérias lácticas (BAL). BAL são microrganismos que possuem participação ativa em processos fermentativos e algumas espécies são probióticas, inibindo direta ou indiretamente microrganismos deterioradores ou patogênicos por meio de compostos formados durante a fermentação. Em alimentos, *Staphylococcus aureus* podem causar intoxicações, por produção de uma enterotoxina termorresistente. Estudos comprovam que as BAL isoladas de Kefir inibem patógenos, mas são poucos os estudos que evidenciam sua eficácia frente a *S. aureus*. O objetivo do trabalho foi identificar esse caráter inibitório das BAL isoladas de grãos de Kefir provenientes de água e de leite. Foi utilizado o método *spot-on-the-lawn* para o teste de antagonismo das culturas de BAL (9U2- *Leuconostoc mesenteroides*, 3P- *Lactobacillus lactis*, 23P3- *Lactobacillus satsumensis*, 17P2- *Lactobacillus perolens* e 11P3- *Lactobacillus perolens*), que foram inoculadas em placas com MRS Agar 1,5% por picada e incubadas a 37°C por 24h. Posteriormente foi adicionada uma sobrecamada de BHI agar semi-sólido 1% inoculada com *S. aureus* (5µL/mL). As placas foram novamente incubadas a 37°C por 24h. Os testes foram realizados em triplicata. Foram observados os halos de inibição, medidos através de paquímetro. Os valores médios de halos (em mm) encontrados foram: 18,45±0,47; 17,63±0,87; 17,61±0,38; 17,24±0,52 e 19,11±1,94 para 9U2, 3P, 23P3, 11P3 e 17P2, respectivamente. Todas as cepas testadas apresentaram ação inibitória frente ao patógeno, constituindo-se em um agente promissor para uso em alimentos como conservante natural.

**Palavras chave:** Kefir, Bactérias lácticas, Bacteriocinas, *Staphylococcus aureus*, teste *Spot-on-the-lawn*.

**Agradecimento:** A professora Elisabeth Neumann pela ICB - UFMG cessão bactérias lácticas.



## **RESUMOS**

**Número: 190**

### **EFEITO DE BIOINOCULANTES PRÉ-COMERCIAIS FORMULADOS COM DIFERENTES CEPAS DE *Bacillus* NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE MILHO**

Oliveira, R.S.<sup>1</sup>; Ribeiro, V.P.<sup>2</sup>; Carvalho, C.<sup>3</sup>; Oliveira, K.H.D.<sup>4</sup>; de Sousa, S.M.<sup>2,3,5</sup>; Lana, U.G.P.<sup>3,5</sup>; Rodrigues, M.E.G.M.<sup>3</sup>; Oliveira, C.A.<sup>3,5</sup>; Gomes E.A.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Faculdade Ciências da Vida, Sete Lagoas, MG. <sup>2</sup>Universidade Federal de São João del-Rei, São João del-Rei, MG. <sup>3</sup>Centro Universitário de Sete Lagoas - UNIFEMM, Sete Lagoas, MG. <sup>4</sup>Escola Técnica Municipal de Sete Lagoas, MG. <sup>5</sup>Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

E-mail: ramon.s.oliveira@outlook.com

Microrganismos com potencial para a promoção de crescimento vegetal podem ser utilizados como bioestimulantes aplicados diretamente na semente, planta ou na rizosfera e podem auxiliar na fixação de nitrogênio, solubilização de fósforo e/ou estimular a produção de fitormônios, melhorando o desenvolvimento tanto do sistema radicular como da parte aérea. O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficiência de quatro bioinoculantes pré-comerciais desenvolvidos com cepas de *Bacillus* na promoção de crescimento de plântulas de milho em cultivo hidropônico. Após germinação por quatro dias, as plântulas de milho foram crescidas em solução nutritiva de Hoagland modificada em sistema *floating* em câmara de crescimento por sete dias. Posteriormente, as raízes foram imersas por seis horas em bioinoculantes líquidos formulados individualmente com quatro cepas de *Bacillus* (B1 a B4) ou na combinação dupla entre eles na concentração de  $10^7$  unidades formadoras de colônias/mL, além do tratamento controle sem inoculação. Após a incubação, as plântulas foram recolocadas em solução nutritiva e foram avaliadas quanto ao crescimento radicular e peso seco após dez dias. O bioinoculante B3 e as combinações B2+B3, B2+B4 e B3+B4 promoveram aumento significativo no comprimento radicular e peso seco total das plântulas de milho em comparação com o controle sem inoculação. Com exceção de B1, os demais produtos foram eficientes na promoção de crescimento de plântulas de milho quando utilizados individualmente ou combinados, indicando sinergismo entre os bioinoculantes B2, B3 e B4. Novos experimentos serão conduzidos em condições de casa de vegetação e campo para validação dos resultados.

**Palavras chave:** Microrganismos, promotores de crescimento, hidroponia, *Zea mays*.

**Apoio financeiro:** EMBRAPA, FAPEMIG e CNPq.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 191**

***Aggregatibacter actinomycetemcomitans* MUTANT WITH LEUKOTOXIN A GENE DELETION AS A TOOL TO UNDERSTAND DYSBIOTIC BIOFILM**

Borges VM<sup>1</sup>, Gurgel ILS<sup>2</sup>, Soriano FM<sup>2</sup>, Souza DG<sup>1</sup>, Madeira MFM<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia - Instituto de Ciências Biológicas (ICB); <sup>2</sup>Departamento de Biologia Geral – Instituto de Ciências Biológicas (ICB);

Email do apresentador: viniciusborgesbio@gmail.com

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, the etiological agent of aggressive periodontitis, is a candidate for “keystone pathogen” – a low-abundance microbial pathogen in bucal biofilm that can orchestrate inflammatory disease by remodeling a normally microbiota in a dysbiotic biofilm are still unknown. In order to clarify these interactions, this study aimed to generate mutants by gene deletion of virulence factors involved in the pathogenesis of periodontal disease (PD). The leukotoxin A is an important virulence factor which interacts with  $\alpha$ 2 integrin, accounts for the selective killing of leukocytes. Thus, a gene deletion cassette was constructed, by the *Saccharomyces cerevisiae* molecular system, targeting the leukotoxin A gene. The cassette was then transmitted to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* by a conjugative strain of *Escherichia coli* and the homologous recombination process incorporated it at the bacterial genome. For select the mutant, the spectinomycin resistance gene had been added to the cassette, flanking the gene sequence. After, we intend to use a murine model of PD using *A. actinomycetemcomitans* WT or mutant in order to evaluate alveolar bone loss, bacterial growth and association with early colonizers, together with in vitro experiment of oral biofilm.

**Uniterms:** Periodontal Disease; Leukotoxin A; Gene deletion cassette; Conjugative system;  
**Supported by:** CAPES, FAPEMIG, CNPq.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 192**

**TAXONOMIA DE BACTÉRIAS: UMA ABORDAGEM POLIFÁSICA**

GUIMARÃES, M. V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Estudante de Microbiologia Aplicada, UFMG, Belo Horizonte, MG. Email: mateusvitorino@gmail.com

Algumas das características mais notáveis de vírus e bactérias são: a sua elevada taxa de adaptação, mutação e reprodução, podendo assim gerar novas linhagens a cada geração em um curto espaço de tempo. Estas mutações podem ser de apenas uma base nitrogenada, causando assim doenças nos seres humanos. Portanto, novas técnicas estão sendo utilizadas para detecção de linhagens de bactérias com pequenas variações. Devido ao micro tamanho de seres procariotos, não podemos observar as características morfológicas para uma melhor classificação, consequentemente o conceito de especiação não se aplica aos microrganismos. Portanto tem-se a taxonomia polifásica, onde uma série de fatores é levada em conta para se chegar a uma classificação taxonômica em nível de espécies e linhagens de bactérias. Dentre as características, duas são de principal importância: a similaridade genômica baseada na hibridização de DNA e a comparação das sequências das pequenas subunidades de rRNA. Outras técnicas como a análise fenotípica, onde se observam os aspectos morfo-fisiológicos dos microrganismos, também servem como base para uma classificação mais específica. A característica de fingerprint devido a sua grande especificidade complementa e reforça dados divergentes em relação a sequências de bases nitrogenadas. Os objetivos da pesquisa foram caracterizar e descrever os mecanismos atuais para classificação de bactérias. O embasamento desta pesquisa foi à coleta de dados de revisão literária, em base de domínio público como NCBI. A soma de todas estas características e técnicas serve como suporte para que se possa classificar em um alto grau de especificidade uma nova espécie/ linhagem, permitindo assim aos microbiologistas decifrarem as relações filogenéticas entre os grupos de microrganismos. Portanto, as novas linhagens recentemente isoladas devem ser classificadas com base na abordagem polifásica.

**Palavras-chave:** Polifásica; Taxonomia; Bactérias; rRNA.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 193**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E MONITORAMENTO DE MICRORGANISMOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO EM MILHO**

Rodrigues, M.E.G.M.<sup>1</sup>; Ribeiro, V.P.<sup>2</sup>; Oliveira, R.S.<sup>3</sup>; Tavares, A.N.G.<sup>3</sup>; Gomes E.A.<sup>4</sup>; de Sousa, S.M.<sup>1,2,4</sup>; Carvalho, C.<sup>1</sup>; Oliveira, C.A.<sup>1,4</sup>; Lana, U.G.P.<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Centro Universitário de Sete Lagoas - UNIFEMM, Sete Lagoas, MG. <sup>2</sup>Universidade Federal de São João del-Rei, São João del-Rei, MG. <sup>3</sup>Faculdade Ciências da Vida, Sete Lagoas, MG. <sup>4</sup>Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. E-mail: [marinaegmrodrigues@gmail.com](mailto:marinaegmrodrigues@gmail.com)

O uso de microrganismos como promotores do crescimento vegetal é uma prática agrícola promissora, tanto em termos ambientais como econômicos. Dentre os principais mecanismos de promoção de crescimento destacam-se a fixação biológica de nitrogênio, solubilização/mineralização do fósforo, produção de sideróforos e fitomônios. Além de atuarem na promoção de crescimento de plantas, estes microrganismos podem ser fonte de produtos e/ou genes de interesse agronômico, dentre outros processos biotecnológicos. O objetivo deste trabalho foi caracterizar e desenvolver marcadores moleculares específicos visando à rápida identificação e monitoramento de microrganismos associados à promoção do crescimento de milho. Foram selecionadas cinco cepas (B1 a B5) pertencentes ao banco de microrganismos multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo. O sequenciamento parcial da região 16S rDNA revelou que todos os isolados pertencem ao gênero *Bacillus*. As técnicas moleculares de Rep-PCR (amplificação de elementos repetitivos) e ARDRA (análise de restrição de DNA ribossomal amplificado) foram eficazes na diferenciação dos isolados, sendo possível observar que os isolados B4 e B5 apresentam perfis idênticos. Na análise de monitoramento dos microrganismos em plântulas de milho cultivadas em solução nutritiva foi observada uma maior população endofítica bacteriana na parte aérea das plantas inoculadas em relação ao controle sem inoculação. Além disso, os isolados B2, B3 e B4 promoveram aumento significativo da área de superfície radicular e peso seco total das plântulas de milho. Os marcadores cepas-específico desenvolvidos com base no genoma dos isolados B2 e B3 podem ser utilizados para proteção contra biopirataria, além de contribuir para o monitoramento e entendimento dos mecanismos associados à colonização bacteriana e promoção de crescimento de plantas.

**Palavras-chave:** Bactérias, Promoção de crescimento, Monitoramento molecular, *Zea mays*  
**Apoio Financeiro:** EMBRAPA, FAPEMIG e CNPq.



## **RESUMOS**

**Número: 194**

### **UTILIZAÇÃO DE CULTURAS LÁCTEAS COMERCIAIS PARA DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA FERMENTADA PROBIÓTICA A BASE DE EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA (EHS).**

**VIEIRA, M.C.<sup>1,2</sup>; LACERDA, I.C.A.<sup>2</sup>; CARREIRA, R.L.<sup>3</sup>; FALEIRO,L.R.<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Alimentos, Escola de Nutrição, UFOP, Ouro Preto, MG. <sup>2</sup>Laboratório de Microbiologia Industrial e Biocatálise, Departamento de Alimentos, Escola de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte, MG. <sup>3</sup>Laboratório de Química de Alimentos, Departamento de Alimentos, Escola de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte, MG. <sup>4</sup>FAVENI, Venda Nova do Imigrante, ES. Brasil. E-mail: [michelechristinav@yahoo.com.br](mailto:michelechristinav@yahoo.com.br).

Os probióticos podem ser definidos como microrganismos vivos que quando ingeridos em quantidade suficiente promovem benefícios à saúde do hospedeiro equilibrando a microbiota intestinal. Os *L. acidophilus* são reconhecidos como cultura probiótica e sua utilização como cultura pura ou combinada com outras bactérias lácticas, como *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*, apresentam bons resultados no desenvolvimento de bebidas fermentadas utilizando base láctea ou vegetal. A soja e seus derivados têm recebido atenção em pesquisas por serem importantes fontes oligossacarídeos com potencial prebiótico (rafinose e estaquiose). O extrato hidrossolúvel de soja (EHS) possui qualidades que permitem utilizá-lo como base para obtenção de produtos fermentados por possuir composição semelhante ao leite de vaca. O objetivo deste estudo foi desenvolver uma bebida fermentada probiótica a base de EHS utilizando cultura comercial para iogurte YF-L812 (Chr. Hansen) combinada com *L. acidophilus* (LA-5, Chr. Hansen). As bebidas produzidas foram armazenadas a 8 ± 2°C e avaliadas, semanalmente, durante 28 dias em relação a viabilidade das culturas por meio da técnica de semeadura em profundidade. Utilizou-se MRS ágar para contagem da cultura YF-L812 e MRS-BILE ágar para contagem do *L. acidophilus*. Durante o período analisado, a cultura YF-L812 apresentou redução de 1,3 ciclos log na contagem de células viáveis enquanto a cultura de *L. acidophilus* apresentou redução de 3,2 ciclos log no mesmo período. A propriedade funcional da bebida permaneceu até o 21º dia de armazenamento, onde o número de células viáveis de *L. acidophilus* atenderam os valores definidos pela legislação vigente ( $10^8$  a  $10^9$  UFC/porção). Desta forma, conclui-se que a utilização da cultura comercial YF-L812 combinada com *L. acidophilus*, apresenta potencial tecnológico no desenvolvimento de novos produtos fermentados probióticos a base de soja atendendo os requisitos legais para alimentos com alegações de propriedades funcionais.

**Palavras chave:** Probióticos, bebidas de soja, viabilidade.

**Apoio Financeiro:** CNPq e UFOP.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 195**

### **BIOPROSPECÇÃO IN SILICO DE SNAKINAS NO GENOMA DE *Beta vulgaris* L.**

**BORGES, D. S<sup>1</sup>; ALMEIDA, I. P.<sup>1</sup>; BARBOSA, A. E. A. D<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Laboratório de Engenharia Genética Vegetal, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Campus Avançado de Patos de Minas. E-mail: [daaysborges@gmail.com](mailto:daaysborges@gmail.com)

Devido ao surgimento de bactérias resistentes a antibióticos existe a necessidade de buscar novos compostos contra esses organismos como, por exemplo, os peptídeos antimicrobianos (AMPs). Os AMPs apresentam massa molecular inferior a 10 kDa e atuam por meio do rompimento físico da membrana celular bacteriana, e geralmente possuem baixa toxicidade contra células de mamíferos. Dentre os AMPs, a família de peptídeos snakinas contêm 12 resíduos de cisteína conservados, aproximadamente 60 aminoácidos, seis ligações de dissulfeto e duas α-hélices longas. Possuem atividade antibacteriana e antifúngica e, por isso, essas snakinas podem ser utilizadas no desenvolvimento de novos antibióticos. Neste estudo, foram caracterizados genes de snakinas no genoma de beterraba (*Beta vulgaris* L.) utilizando ferramentas de bioinformática. Os genes foram localizados usando tblasn contra o genoma de *B. vulgaris* L., seguido da análise de domínios conservados com o Blast2go e alinhamento na ferramenta BioEdit. Foram realizadas análises filogenéticas para a identificação das famílias das snakinas encontradas, e a modelagem da estrutura 3D foi realizada no Swiss Model. Foram encontradas 20 snakinas, e todas apresentaram 12 cisteínas conservadas, localizadas nos cromossomos 1,3,4,5,6,7,8 e 9. As estruturas 3D obtidas são típicas desta família e através da árvore filogenética foi identificado que as sequências pertencem as subfamílias de snakinas do tipo 1 (4 genes), do tipo 2 (8 genes) e do tipo 3 (8 genes). O estudo desses genes é de suma importância para o desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes a patógenos e de novos antibióticos.

**Palavras-chave:** *Beta vulgaris* L., Snakinas, Bioinformática.

**Apoio financeiro:** UFU



## **RESUMOS**

**Número: 196**

### **PROSPECÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE BACTÉRIAS CULTIVÁVEIS ASSOCIADAS A PLANTAS ENDÊMICAS E SOLOS DE CAMPOS RUPESTRES FERRUGINOSOS**

Érica B. Felestrino<sup>1,2</sup>, Izadora Tabuso Vieira<sup>2</sup>, Flávio Fonseca do Carmo<sup>3</sup>, Luciana Kamino<sup>3</sup>, Leandro M. Moreira<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB), Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brasil. <sup>2</sup>Laboratório de Genômica e Intereração Bactérias Ambiente, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brasil. <sup>3</sup>Instituto Prístino, Belo Horizonte, MG, Brasil. <sup>4</sup>Departamento de Ciências Biológicas (DECBI), Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, *Campus Morro do Cruzeiro*, Ouro Preto, MG, Brasil

A ciclagem de nutrientes, a promoção do crescimento de plantas, a biorremediação de ambientes contaminados e o controle biológico de pragas são algumas das funções que residem em meio à diversidade genética e metabólica dos microrganismos associados a plantas. Afim de avaliar esse potencial, este trabalho objetivou isolar bactérias cultiváveis associadas a plantas endêmicas dos campos rupestres ferruginosos do Quadrilátero Ferrífero (QF). Para isto, foram coletadas amostras de raiz e solo associado a nove espécies de plantas endêmicas da Serra da Moeda, MG, além de amostras de solo e raízes emergentes de uma caverna de canga da mesma região. Foram obtidos 204 isolados bacterianos, dos quais 5,9% foram capazes de solubilizar fosfato, 2,5% de fixar N<sub>2</sub> atmosférico, 26,5% de produzir ácido-indol acético (AIA), 10,3% de sintetizar sideróforos, 23% de produzir ácido cianídrico (HCN), 24% de produzir amilase, e 39,7% de produzir protease. Além disso, quatro isolados (1,96%) foram capazes de inibir o crescimento de *Xanthomonas citri* (Xac306) *in vitro*, reduzindo em mais de 60% das lesões crônicas induzidas por este fitopatogênio quando co-inoculadas em plantas de laranja doce (*Citrus sinensis*). Outros cinco isolados (2,45%) foram resistentes a elevadas concentrações de arsenito (As<sup>+3</sup>) e arsenato (As<sup>+5</sup>), 5 e 800 mM respectivamente. Estes foram submetidos a espectrometria atômica de raio-X que mostrou redução de até 50% de arsenito e 80% de arsenato em alguns dos isolados. Em todos os isolados foi identificado o metaloide adsorvido na parede quando analisados por microscopia eletrônica de varredura com EDS. Estes resultados denotam uma grande importância em estudo de vegetações associadas a afloramentos rochosos no Brasil uma vez que se apresentam como formações únicas, com diversas peculiaridades e altas taxas de endemismos e de raridade.

**Palavras chaves:** biofertilizantes, biorremediadores, arsênio, biocontroladores *Xanthomonas citri*.

**Apoio:** FAPEMIG, CAPES e CNPQ



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 197**

**CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO ISOLADAS DE SOLO DO CERRADO**

Oliveira, J.C.M.D.<sup>1</sup>; Abreu, C.S.<sup>1</sup>; Lana, U.G.P.<sup>2</sup>; Figueiredo, J.E.F.<sup>2</sup>; Oliveira, C.A.<sup>2</sup>; Gomes, E. A. <sup>2</sup>; Resende-Stoianoff, M.A.<sup>1</sup>; Marriel, I.E.<sup>2,3</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Micologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. <sup>2</sup>Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo, EMBRAPA MILHO E SORGO, Sete Lagoas, MG. <sup>3</sup>UFSJ, Sete Lagoas, MG, Brazil. E-mail: [joaoemd@yahoo.com.br](mailto:joaoemd@yahoo.com.br)

As actinobactérias representam um grupo abundante e diversificado de bactérias filamentosas Gram-positivas encontradas principalmente no solo e que se destacam pela capacidade em produzir inúmeros compostos bioativos como os antibióticos e enzimas. Além de antibióticos, as enzimas são os produtos mais explorados pela indústria biotecnológica em diversos processos, a exemplo da hidrólise de polímeros, síntese de compostos, etc. O objetivo deste trabalho foi caracterizar 69 isolados de actinobactérias obtidos de amostras de solo do cerrado usando método molecular e avaliar a atividade enzimática (amilase, celulase e lipase). O índice enzimático (EI) foi estimado pela relação entre o diâmetro (mm) do halo de hidrólise e o diâmetro (mm) da colônia de cada estirpe. A análise molecular do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA revelou a existência de 49 espécies. Todas as espécies foram agrupadas em três gêneros: *Streptomyces* (82,61%), *Kitasatospora* (10,14%) e *Amycolatopsis* (7,25%). Os valores do índice enzimático (EI) para amilase, celulase e lipase foram altamente variáveis. A atividade da amilase foi detectada em 53 (76,81%) isolados, dos quais apenas dezoito apresentaram EI > 4,0. Os maiores valores de EI foram observados para os isolados ACT 1 (*S. curacoi*) e ACT 2 (*S. hygroscopicus*) que foram de 6,44 e 6,42, respectivamente. A atividade da celulase variou significativamente ( $P \leq 0,05$ ) entre os isolados. Vinte e nove (42,02%) isolados apresentaram alta atividade da celulase, e os isolados ACT 3 (*S. chiangmaiensis*) e ACT 4 (*S. cyslabdanicus*) apresentaram valores de EI mais elevados (6,56 para ambos os isolados). A atividade da lipase também variou estatisticamente ( $P \leq 0,05$ ) e 14 isolados (20,29%) foram considerados bons produtores de lipase (EI > 2,0). O isolado ACT 2 (*S. hygroscopicus*) mostrou o maior valor de EI de 2,60. Os presentes resultados mostraram o alto potencial biotecnológico industrial de diferentes actinobactérias isoladas de solo do cerrado.

**Palavras-chave:** actinomicetos, morfologia, 16S rRNA, enzima, *Streptomyces*

**Apoio financeiro:** Embrapa Milho e Sorgo, Capes, CNPq, Fapemig.



## **RESUMOS**

**Número: 198**

### **TAXA DE MORTALIDADE E DESENVOLVIMENTO PONDERAL DE CAMUNDONGOS BALB/c TRATADOS COM *Lactobacillus plantarum* B7 E *Lactobacillus rhamnosus* D1 E INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE POR *Listeria monocytogenes***

Valente, G. L. C<sup>1</sup>., Acurcio L. B.<sup>2</sup>, Nicoli, J. R.<sup>2</sup>, Souza, M. R.<sup>1</sup>, Silva, A. M.<sup>3</sup>, Penna, C. F. A. M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, MG. <sup>2</sup>Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG.

<sup>3</sup>Universidade Federal de São João del-Rei, Sete Lagoas, MG, Brasil. E-mail: gustlcv.vet@gmail.com

*Lactobacillus* spp. são considerados probióticos quando promovem benefícios à saúde do consumidor ao serem administrados em concentrações adequadas. Dentre os benefícios está a proteção do organismo contra infecções devido a mecanismos como: competição por nutrientes e sítios de ligação, antagonismo direto e modulação da resposta imune e inflamatória, dentre outros. Listeriose é uma doença causada pelo consumo de alimentos contaminados por *Listeria monocytogenes* (LM), sendo dividida clinicamente nas formas não invasiva (sinais gastrintestinais) e invasiva (sinais sistêmicos). O objetivo deste estudo foi determinar as taxa de sobrevida e desenvolvimento ponderal de camundongos tratados e não tratados com *Lactobacillus* spp. em um modelo murino de infecção experimental por LM. Os microrganismos utilizados no estudo foram *L. rhamnosus* (D1) e *L. plantarum* (B7) isolados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra, com potencial probiótico comprovado *in vitro* e *in vivo*; e LM ATCC 15313. Camundongos machos de sete semanas de idade da linhagem BALB/c foram divididos em três grupos de 14 animais, sendo tratados previamente com os lactobacilos por gavagem diária durante quatro semanas, com 100µL de respectivamente: salina, B7 ( $10^8$  UFC) e D1 ( $10^8$  UFC). No 10º dia de tratamento, todos os animais foram infectados, via veia caudal, por 50µL de inóculo de LM ( $2 \times 10^7$  UFC). Durante todo o período, os animais foram pesados a cada 48h. Após a infecção, foram constatados que os óbitos se concentraram nos dias 3 e 4 pós-infecção, atingindo 50% dos animais controle, 50% dos tratados com D1 e 64,29% dos que receberam B7. Apenas no grupo tratado com D1 foi observado um aumento de peso significativo dos animais ao longo do tratamento, persistindo até mesmo após a infecção. Embora os resultados não demonstrem um efeito protetor evidente das amostras testadas de *Lactobacillus* spp., foi possível determinar um modelo de infecção murino agudo para LM (com DL50 após quatro dias de infecção).

**Palavras chave:** curva de morte, *Lactobacillus*, *Listeria monocytogenes*, infecção experimental, efeito protetor

**Apoio financeiro:** CNPq, CAPES e FAPEMIG.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 199**

### **OBTENÇÃO DE HÍBRIDOS DE *SACCHAROMYCES* spp. PARA A PRODUÇÃO DE CERVEJAS ESPECIAIS E CACHAÇA**

Alvarenga, F. B. M.; Matos, T. T. S.; Rosa, C. A.

Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos, Departamento de Microbiologia, ICB, UFMG, Belo Horizonte, MG.

e-mail: thelmatirones@gmail.com /flaviabmalvarenga@gmail.com

O Brasil apresenta um rico mercado de bebidas fermentadas e destiladas. Dentre estas bebidas, podem-se destacar as cachaças e as cervejas especiais que sofrem processos fermentativos envolvendo linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. Para a produção da cachaça já existem pelo menos três linhagens de leveduras comerciais brasileiras sendo utilizadas pelos produtores, no entanto, em pequena escala. Este número é pequeno quando comparado ao banco de linhagens comerciais próprias para a produção de cervejas, com mais de 100 linhagens disponíveis comercialmente. Uma alternativa para propiciar a melhora da cachaça e cerveja, é a obtenção de híbridos entre linhagens de *S. cerevisiae* ou entre esta e outras espécies produtoras de aromas do gênero *Saccharomyces*. Os híbridos são resultantes de cruzamentos de linhagens naturais de leveduras o que não os torna um organismo geneticamente modificado. Um exemplo de híbrido de ampla utilização é o *S. pastorianus* (*S. cerevisiae*/ *S. eubayanus*); acredita-se que o processo de hibridação ocorreu espontaneamente há cerca de 600 anos, quando as leis alemãs obrigaram os fabricantes de cerveja a usarem temperaturas de fermentação mais baixas, promovendo a seleção de híbridos naturais. O desenvolvimento de híbridos interespecíficos já foi realizado para vinhos, a partir de cruzamentos de isolado industrial de *S. cerevisiae* com *S. bayanus*, *S. kudriavzevii*, *S. uvarum* e *S. mikatae*. Para a produção de cerveja, foi realizado o cruzamento de *S. cerevisiae* e *S. bayanus*, que apresentou boa fermentação em escala laboratorial, além de produção de etanol superior a das leveduras parentais. O emprego de híbridos para a produção de cerveja pode reduzir significativamente os seus custos de produção a partir da diminuição de importação de leveduras; para a cachaça, auxiliará na padronização de culturas iniciadoras, padronizando a bebida ao longo da safra e entre safras e garantindo boa qualidade do produto final.

**Palavras chave:** *Saccharomyces* spp.; cerveja; cachaça; híbrido.

**Apoio financeiro:** CAPES, FAPEMIG e CNPq



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 200**

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XILITOL POR LINHAGENS DE  
*Cyberlindnera xylosilytica* E *Wickerhamomyces rabaulensis***

Palladino, F<sup>1</sup>., Cadete, R.M<sup>1</sup>., Rodrigues, R.C.L.B<sup>2</sup>., Rosa, C.A<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG

<sup>2</sup>Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, SP.

Subprodutos agroindustriais, como o bagaço de cana de açúcar, são ricos em açúcares, como xilose, e podem ser utilizados como matérias primas para a obtenção de produtos de interesse econômico. Dentre estes, destaca-se o xilitol, adoçante natural utilizado nas indústrias farmacêuticas e de alimentos. Leveduras que utilizam xilose como fonte de carbono apresentam potencial para produzir xilitol. Este trabalho propõe a investigação da produção de xilitol por linhagens das leveduras *Cyberlindnera xylosilytica* e *Wickerhamomyces rabaulensis*. A partir do cultivo em meio contendo xilose como única fonte de carbono, foram calculados os parâmetros fator de conversão de substrato em produto, Y<sub>p/s</sub> (g/g), e produtividade volumétrica, Q<sub>p</sub> (g/L/h). Os melhores resultados, comprovados estatisticamente, foram alcançados pelas linhagens de *C. xylosilytica* UFMG-CM-Y409 (0,83g/g e 0,58g/L/h, em 48h) e UFMG-CM-Y309 (0,87g/g e 0,65g/L/h, em 72h), e pelas linhagens de *W. rabaulensis* TO 56.1 (0,70g/g e 0,71g/L/h) e TO 68.1.1 (0,72g/g, 0,82g/L/h), ambas em 48h. Na sequência, a partir do cultivo em hidrolisado de bagaço de cana de açúcar e utilizando-se as linhagens mencionadas, foi executado um estudo para avaliação da influência da suplementação na produção de xilitol, empregando-se os nutrientes sulfato de amônio (0-2 g/L), extrato de farelo de arroz (5-10 g/L), e extrato de levedura (1-2 g/L), por meio de um planejamento fatorial 2<sup>3</sup>. As linhagens de *C. xylosilytica* tiveram destaque quanto à produção de xilitol no ensaio contendo nível máximo de farelo de arroz e nível mínimo de sulfato de amônio e de extrato de levedura, apresentando uma produção de xilitol que variou de 0,55-0,63g/g e 0,17-0,20g/L/h. Para as linhagens de *W. rabaulensis* somente a adição de extrato de levedura foi significativa ( $p<0,05$ ) no favorecimento da produção de xilitol. Este trabalho evidencia a importância de estudos na aplicação biotecnológica de leveduras para a obtenção industrial de produtos de valor agregado.

**Palavras-chave:** *Cyberlindnera xylosilytica*; *Wickerhamomyces rabaulensis*; hidrolisado de bagaço de cana de açúcar; xilitol

**Apoio Financeiro:** CNPq, FAPESP.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 201**

### **CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DE GENES RELACIONADOS À VIA SUMO DO FUNGO *Aspergillus fumigatus***

**SILVA, TM<sup>1</sup>; SILVA, VNM<sup>1</sup>; VIANA, JV<sup>1</sup>; MORAIS, ER<sup>1</sup>; GOMES, MS<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Bioinformática e Análise Molecular, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Campus Avançado de Patos de Minas.

*Aspergillus fumigatus* é um fungo saprófita e oportunista que pode causar a aspergilose invasiva pulmonar, com elevadas taxas de mortalidade, mesmo após a administração de terapia antifúngica e principalmente em pacientes imunocomprometidos. As principais razões apontadas para o fracasso do tratamento incluem: baixa biodisponibilidade dos fármacos e a resistência de algumas cepas de aos antifúngicos disponíveis. Há várias vias de sinalização que podem ser importantes para o processo infeccioso de *A. fumigatus*, como a via Sumo, ainda não caracterizada neste patógeno. Esta é essencial para manter a homeostase quando a célula se encontra em estresse endógeno ou ambiental, tais como choque térmico, falta de nutrientes, ou estresse osmótico. Além disso, tem funções importantes em outros processos celulares como a reparação do DNA, transcrição e divisão celular. O objetivo deste estudo foi caracterizar *in silico* a via Sumo de *A. fumigatus* à procura de alvos potenciais para novos fármacos. A busca dos genes associados à via Sumo foi realizada no banco de dados genômico do fungo e no NCBI. A sequência das proteínas foi analisada no banco de dados Pfam para busca de domínios. A sequência gênica e proteica de vários fatores relacionados ao sumo foram encontradas, dentre eles: Smt3 (Afu1g10850) e Ulp1 (Afu5g14040). Domínios altamente conservados entre os ortólogos específicos de cada proteína foram encontrados, *Rad60-SLD Family* (PF11976.5) na Smt3 e *Peptidase\_C48*(PF02902.16) na Ulp1. A partir destas análises, é possível concluir que a via Sumo está presente em *A. fumigatus* e que deve ser estudado mais a fundo para a seleção de novos alvos potenciais para fármacos. Além disso, mais estudos são necessários para elucidar vários aspectos que permanecem obscuros em relação a esta via e sua possível relação com a patogenicidade do fungo.

**Palavras-chave:** *Aspergillus fumigatus*. Sumo. Bioinformática.

**Agradecimentos:** Universidade Federal de Uberlândia (UFU); Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 202**

**UTILIZAÇÃO DE SOLUÇÃO DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO NO CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO DE SUBSTRATO DE CULTIVO DE *Pleurotus ostreatus* A BASE DE CASCA DE CAFÉ**

Souza, J.R.<sup>1</sup>; Castro, C.P.<sup>1</sup>; Moraes, T.S.J.<sup>1</sup>; Antunes, L.A.<sup>1</sup>; Vilela, L.F.<sup>1</sup>; Dias, E.S.; Zied<sup>2</sup>, D.C.

<sup>1</sup>Laboratório de Cultivo de Cogumelos Comestíveis, Setor Microbiologia, Departamento de Biologia, UFLA, Lavras, MG, Brasil. <sup>2</sup>Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (FCAT), Câmpus de Dracena, SP. E-mail: [jessicaveterinaria@posgrad.ufla.br](mailto:jessicaveterinaria@posgrad.ufla.br)

A utilização da casca de café tem sido sugerida no cultivo de cogumelos do gênero *Pleurotus*, devido à alta disponibilidade deste resíduo no Brasil, somada à alta adaptabilidade de crescimento deste tipo de fungo a diferentes resíduos agrícolas. No entanto, um alto nível de contaminantes e a presença de agentes inibidores do crescimento de cogumelos a partir da casca de café são fatores limitantes. Neste sentido, a imersão do substrato em solução de hidróxido de cálcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) pode ser uma opção de baixo custo para pequenos produtores no controle de contaminação. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tempo de imersão do substrato em uma solução de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  na produção de cogumelos *Pleurotus ostreatus*. O substrato utilizado foi produzido a partir de casca de café (5 kg) e bagaço de cana-de-açúcar (15 kg). A mistura foi submersa em solução de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  a 1% em diferentes períodos (4, 6, 8, 10 e 12 horas). O excesso de água foi drenado durante 2 horas e o substrato inoculado com 3% de matriz secundária de *Pleurotus ostreatus*. Após inoculação, o substrato foi acondicionado em sacos plásticos (600 g/bloco), totalizando 8 repetições por tratamento. Os blocos foram distribuídos aleatoriamente por prateleiras em sala de cultivo a  $26^\circ\text{C} \pm 3$  e  $85\% \pm 5$  de umidade. Após completa colonização, o plástico foi removido para indução de frutificação. Para cálculo da produtividade, os cogumelos colhidos durante 30 dias foram pesados e os resultados submetidos ao teste de Tukey com 5% de probabilidade. A produtividade não diferiu estatisticamente entre os diferentes tempos de imersão em  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  variando de 10,6 a 12,87%. Independentemente do tempo de imersão, a solução de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  a 1% não impediu a contaminação antes da frutificação. Entretanto, ao longo, do crescimento fúngico, esta contaminação foi controlada sem comprometimento da produtividade dos blocos, sendo necessário testar outras concentrações de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  para controle de contaminantes na produção de cogumelos.

**Palavras-chave:** Controle de contaminantes. Cultivo de cogumelos. Resíduos agrícolas.

**Apoio financeiro:** CAPES, CNPQ, FAPEMIG.



## **RESUMOS**

**Número: 203**

### **EVIDÊNCIAS CIENTÍFICAS DOS EFEITOS BENÉFICOS À SAÚDE HUMANA RELACIONADO A KOMBUCHA**

Guedes.S.C<sup>1</sup>;Barbosa.C.D<sup>1,2</sup>;Freitas.G.R.O

<sup>1</sup>Faculdade federal de Uberlândia, UFU, Patos de Minas, MG. <sup>1,2</sup> Departamento de Tecnologia de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, MG. <sup>2</sup> Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Patos de Minas, MG.

Kombucha é uma bebida fermentada, refrescante, adocicada e levemente ácida, preparada por infusão de folhas de *Camelia sinensis* adicionada de açúcares e inóculo, sua crescente popularização deve-se essencialmente aos seus alegados efeitos benéficos para a saúde humana (Santos, 2016). Na literatura científica existem estudos que relacionam a sua ingestão com a prevenção de doenças e melhora das funções biológicas (Jayabalan et al 2014). Diante do exposto objetivou-se realizar um levantamento bibliográfico sobre os possíveis benefícios acerca do consumo de kombucha. Realizou-se uma revisão integrativa da literatura em banco de dados (Scielo e NCBI). Verifica-se evidências da utilização da kombucha com atividades antioxidantes (Fu et.al 2014), antimicrobianas (Steinkraus et al., 1996), anticarcinogênicas (Jayabalan et al. 2011) e hepatoprotectora (Watawana et al 2015.) Em relação a atividade antioxidante os ensaios revelaram que a kombucha apresentou efeitos positivos na inibição de radicais livres. Os autores verificaram que a atividade de inibição do crescimento de micro-organismos se devia, majoritariamente, a presença de ácido acético no produto (Steinkraus et al, 1996). Quanto às propriedades anticarcinogênicas e hepatoprotetoras os autores verificaram que existem atividade sobre células carcinogênicas e que a proteção hepática estava relacionada com a inibição da apoptose das células hepáticas. Os relatórios de toxicidade na bebida kombucha são muito raros e dispersos. O consumo de kombucha é contra indicado para pessoas com baixa imunidade, gestantes e lactantes. Apesar de uma quantidade limitada de estudos pode-se concluir que existem efeitos benéficos à saúde humana relacionados ao consumo da bebida. São necessárias mais pesquisas para investigação das propriedades da kombucha e para a determinação da quantidade segura para ingestão.

**Palavras chave:** Kombucha, antioxidante,antimicrobiana,benefícios, saúde



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 204**

**PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E CINÉTICOS DA FERMENTAÇÃO DE KOMBUCHA DE CHÁ PRETO**

Santos, W.C.R.<sup>1</sup>, Barbosa, C. D.<sup>1</sup>, Lacerda, I. A.C<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: wildonestudos@gmail.com

Kombucha é uma bebida asiática obtido pela fermentação da infusão adoçada de *Camellia sinensis* por bactérias ácido acéticas e leveduras, produzindo etanol, ácido acético e outros metabólitos, tais como, ácido glucônico, glucurônico, succínico, dentre outros, que lhe conferem características sensoriais de uma bebida levemente adocicada, ácida e refrescante. Objetivou-se analisar os parâmetros físico-químicos e cinéticos durante a fermentação de kombucha de chá preto. A fermentação foi conduzida em triplicata em recipientes de vidro previamente esterilizados. No preparo, uma infusão de 1,5% m/v de chá preto (1,5 L de água mineral e 10% m/v de sacarose) foi adicionado um inóculo convencional (sendo 10% v/v da parte líquida e 5% m/v da matriz celulósica). Os frascos foram cobertos por tecido de algodão para permitir a passagem de ar e incubados em temperatura ambiente por 20 dias. Durante a fermentação, retirou-se alíquotas (0, 3, 7, 10, 15 e 20 dias) para a determinação dos parâmetros físico-químicos e cálculo dos parâmetros cinéticos. A bebida apresentou ao final da fermentação: teor alcoólico ( $1,37 \pm 0,26 \text{ g.L}^{-1}$ ), açúcares redutores totais residuais – ART ( $9,64 \pm 0,34 \text{ g.L}^{-1}$ ), pH ( $3,02 \pm 0,01$ ), acidez total titulável – ATT ( $5,29 \pm 0,02 \text{ g.L}^{-1}$ ) e rendimento GK final (71,4%) e  $Y_{ac/s}$  ( $0,71 \text{ g. g}^{-1}$ ). Durante a fermentação os parâmetros calculados apresentaram um padrão esperado para esse tipo de processo fermentativo, como por exemplo, baixo teor de etanol residual e aumento gradual da acidez. Entretanto o parâmetro rendimento mostrou-se moderado e ocorreu um aumento expressivo da acidez total. Conclui-se que os parâmetros analisados são satisfatórios do ponto de vista biotecnológico.

**Palavras chave:** bactérias do ácido acético, leveduras, fermentação, acetificação



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 205**

### **ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO METANÓLICO TOTAL DE *Senna rugosa***

**SOUSA, HA<sup>1</sup>; SILVA, VNM<sup>1</sup>; BRASIL, MCOA<sup>1</sup>; LIMA, CF<sup>1</sup>; FREITAS, GRO<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Campus Avançado de Patos de Minas.

Nos últimos anos, o surgimento contínuo de novas cepas de microrganismos resistentes às várias classes de antimicrobianos têm preocupado as autoridades em saúde em todo o mundo. Este fenômeno tem como principal causa o uso irracional e indiscriminado desses quimioterápicos que cada vez mais selecionam cepas resistentes. Esse cenário tem mobilizado muitos estudos com o objetivo de identificar novos compostos antimicrobianos a partir de plantas utilizadas popularmente por diferentes comunidades. Plantas de diversas espécies do gênero *Senna* são utilizadas como laxativos e purgativos, incluindo *Senna rugosa*, uma espécie típica do Cerrado. O presente estudo avaliou a atividade antimicrobiana de extratos metanólicos totais (EMTs) das folhas, flores, cascas e raízes de *Senna rugosa*, contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Aspergillus fumigatus* (CEA117). Utilizando a técnica de extração por esgotamento foi possível obter um excelente rendimento dos EMTs, variando entre 49 e 80%, sendo estes resultados bem superiores aos encontrados na literatura. Através do método de difusão em ágar foi avaliada a atividade antimicrobiana de três diferentes concentrações (500mg/ml, 250mg/ml e 125mg/ml) de cada EMT. Entretanto, nenhum dos extratos apresentou atividade antimicrobiana contra os microrganismos avaliados.

**Palavras-chave:** Cerrado. *Senna rugosa*. Atividade antimicrobiana. Extrato metanólico total.

**Agradecimentos:** Universidade Federal de Uberlândia (UFU); Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 206**

**ISOLAMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS POTENCIAIS PRODUTORES DE AMILASES**

Amorim, I.C.S.<sup>1</sup>, Almeida, A.C.<sup>2</sup>, Benassi, V.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri-UFVJM  
campus Diamantina, Diamantina, Minas Gerais, Brasil.

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri-UFVJM campus Diamantina, Diamantina, Minas Gerais, Brasil.  
e-mail: ingridamorim120@gmail.com

As técnicas tradicionais de isolamento e cultivo associadas às novas tecnologias permitem uma exploração mais abrangente, pois se estima que apenas 10% dos micro-organismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos. Objetivou coletar e isolar fungos filamentosos à partir de quatro amostras de solos, caracterizar microscopicamente, e realizar a identificação morfológica dos fungos isolados. Coletaram-se, de forma asséptica, quatro amostras de solos em diferentes pontos de um lixão da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, na cidade de Diamantina-MG. As amostras coletadas foram levadas para o laboratório, postos sob meio de cultura sólido Aveia 2% (m/v) e Ágar 4% (Emerson, 1941), e mantidas em BOD, à 30°C, para o crescimento e isolamento de fungos filamentosos. Foram isoladas quatro distintas amostras do lixão da UFVJM, das quais a amostra I1 teve crescimento de apenas um fungo filamento, a amostra I2 teve crescimento de seis fungos, sendo eles I2.2.1, I2.2.3, I2.3.1, I2.3.3, I2.3.4 e I2.3.5. Enquanto a amostra I3 apresentou crescimento de três fungos I3.2.1, I3.2.2 e I3.2.3. Por fim, a amostra I4 teve crescimento de quatro fungos filamentosos I4.3.1, I4.3.2, I4.4.1 e I4.4.3. Em seguida foi feito a caracterização morfológica de cada fungo observando uma grande variedade de características, em especial, a coloração, principalmente, branca e verde, sendo observado que alguns possuíram textura aveludada e algodonosa, assim como alguns produziram pigmentação. Por fim, à partir da análise microscópica pode-se observar gêneros *Aspergillus* e *Rhizopus* dentre os isolados. Diante do exposto fica claro que os fungos filamentosos estão presentes em diversos lugares, dentre eles no solo, sendo possível, à partir de uma pequena amostra, fazer o isolamento de quatorze fungos com características macroscopicamente distintas.

**Palavra-chave:** Bioprospecção, Fungos filamentosos, Biotecnologia.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 207**

**PRODUÇÃO DE METABÓLITOS POR *MONACROSPORIUM THAUMASIUM* COM ATIVIDADE NEMATICIDA**

Gouveia, A.S.<sup>1</sup>; Morgan,T<sup>1</sup>; Soares,F.E.F<sup>1</sup>; Sufiate,B.L.<sup>1</sup>; Monteiro,T.S.A<sup>2</sup>; Sudré,P.S.<sup>1</sup>; Ramos, H.J.O.<sup>1</sup>; Queiroz,J.H.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil. E-mail: angelica.s.gouveia@gmail.com

Fungos nematófagos, como *Monacrosporium thaumasium*, são capazes de se alimentarem de nematoides devido à produção de enzimas extracelulares que estão diretamente envolvidas nas etapas da infecção. Este processo pode se tornar mais eficiente quando conjugado com a produção de metabólitos que auxiliam na paralisação do nematoide. O objetivo deste trabalho foi pesquisar a produção de metabólitos com atividade nematicida em fermentado de *M.thaumasium*. Deste modo o fungo foi cultivado em meio sólido utilizando farelo de trigo acrescido de solução de minerais. O extrato bruto foi obtido a partir de uma extração com água. A hipótese foi sustentada a partir de um fracionamento do extrato bruto a qual primeiramente o extrato foi ultrafiltrado em um membrana de 3 kDa, e a fração não retida foi utilizada em uma precipitação com acetona (6:1), em seguida a fração solúvel em acetona foi basificada até pH 11, centrifugou e recuperou o pellet. Este foi mantido a 30 °C até a total evaporação da acetona, ressuspêndido em água e o pH foi corrigido para 7. Esta amostra foi submetida à extração em fase sólida de fase normal, a qual a eluição foi a partir de gradiente de acetonitrila/água. As frações obtidas foram evaporadas e ressuspêndidas em água para realizar o teste nematicida. Somente a fração 40 (40% acetonitrila) causou a mortalidade de *Meloidogyne javanica*. Esta fração foi submetida a uma análise em LC/MS para tentar identificar o composto que causou a mortalidade. Nesta fração foram identificadas betaína e valina, no entanto foi observada a presença de outros compostos e não sendo possível afirmar qual teria atividade nematicida. Estes compostos puros foram testados nos fitonematoídes, mas não houve mortalidade. Deste modo novas metodologias de purificação serão necessárias como o uso de uma coluna mais polar acoplada ao espectrômetro de massa visto que a partir de experimentos realizados o provável composto apresenta características polares.

**Palavras-chaves:** *Monacrosporium thaumasium*, metabólito, fitonematoíde

**Apoio Financeiro:** Capes, CNPq e Fapemig



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 208**

### **ATIVIDADE DE PROTEASE E LIPASE DE FUNGOS ISOLADOS DE UMA MADEIREIRA ABANDONADA EM MARAJÓ, PARÁ, BRASIL**

Moraes, T.S.J.<sup>1</sup>; Antunes, L.A.<sup>1</sup>; Cunha, J.R.B.<sup>1</sup>; Menezes, M.S.C.<sup>1</sup>; Vasconcelos, B.K.S.<sup>1</sup>; Vilela, L.F.<sup>1</sup>; Dias, E.S.<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Cultivo de Cogumelos Comestíveis, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras. Email:[tatianajunqueira2@gmail.com](mailto:tatianajunqueira2@gmail.com)

As proteases são importantes em diversos processos fisiológicos. Pertencem ao grupo mais importante de enzimas e possuem ampla aplicação industrial devido à sua especificidade em ações hidrolíticas. Os fungos podem produzir proteases ácidas, neutras ou alcalinas, ativas em uma ampla faixa de pH. Em relação às lipases, os fungos filamentosos são amplamente reconhecidos como as melhores fontes dessas enzimas, com várias patentes já desenvolvidas. As espécies fúngicas com maior produção de lipases pertencem aos gêneros *Geotrichum*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Rhizomucor*. Entretanto, poucas espécies produzem enzimas com boa estabilidade e capacidade de biocatálise satisfatória para serem consideradas de relevância industrial. O objetivo deste estudo foi avaliar, a partir de testes qualitativos, a atividade de protease e lipase por 12 fungos isolados de fragmentos de madeira de uma madeireira abandonada na região do Marajó, no estado do Pará. A atividade de protease foi avaliada em placas de Petri contendo 1,8 % de ágar, 1% de gelatina e 1% de leite desnatado, adicionado de 400 ml de tampão citrato fosfato 0,1 M (pH 5,0), inoculando-se um disco de 10 mm contendo o micélio do fungo no centro da placa. Para a avaliação da atividade de lipase foi utilizado meio com 1% de peptona, 0,5% de cloreto de sódio, 0,1 % de cloreto de cálcio, 1,5% de ágar adicionado de 1% de Tween 20, seguindo o mesmo procedimento. A incubação foi feita a 25°C por 7 dias. A formação de um halo de degradação indicou a produção de protease, enquanto que a formação de cristais no meio indicou produção de lipase. Dentre os 12 isolados, 3 apresentaram produção de protease e 11 produziram lipase, sendo que os produtores de protease produziram também lipase, demonstrando versatilidade na produção enzimática. Em estudos futuros, os isolados que produzem essas enzimas devem ser identificados, bem como a produção das enzimas deve ser quantificada.

**Palavras-chave:** análise enzimática, fungos amazônicos, madeira.

**Apoio financeiro:** CAPES; CNPQ; FAPEMIG.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 209**

**UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIALIS PARA PRODUÇÃO DE AMILASES POR *Aspergillus* sp. (C4.1) ISOLADO DE BANANEIRA (*Musa* sp.)**

Larissa R. Gomes<sup>(1,\*),</sup> Jordana de J. Silva<sup>(1)</sup>, Karla C.<sup>(1)</sup> e Patrícia N. C. Souza<sup>(1)</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia do Instituto de Engenharia, Ciência e Tecnologia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri-IECT/UFVJM – Janaúba MG. E-mail: [laris913@gmail.com](mailto:laris913@gmail.com)

Em processos biotecnológicos, os fungos filamentosos são agentes primordiais para a produção de biomoléculas, como as amilases, que estão entre as mais importantes enzimas industriais, podendo ser utilizadas em diversos processos, tais como aditivos em detergentes, aplicações nas indústrias têxteis, farmacêutica e de panificação. Estas enzimas hidrolisam as ligações *O*-glicosídicas do amido e, atualmente, substituem quase que completamente a hidrólise química deste carboidrato. Assim, este trabalho objetivou avaliar a produção amilolítica do fungo filamentoso *Aspergillus* sp. (C4.1), isolado do coração da bananeira (*Musa* sp.), utilizando resíduos agroindustriais de baixo custo em fermentação submersa. Para este fim, o fungo foi inoculado em placas de Petri contendo meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) por 7 dias, de onde retirou-se um disco micelial de 6 mm de diâmetro que foi inoculado em Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultura composto por uma solução de sais g/L (15g de Agar; 10g de amido; 6g de NaNO<sub>3</sub>; 1,5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5g MgSO<sub>4</sub>; 0,01 g de FeSO<sub>4</sub> e 0,01g de ZnSO<sub>4</sub>), acrescida de diferentes fontes de carbono: amido, casca da batata doce, farelo de milho e farelo de trigo. Os meios foram então incubados à 30°C por 5 dias, e após este período, foram filtrados para obter o extrato bruto no qual foi dosada a atividade enzimática pelo método do DNS descrito por MILLER (1959), utilizando como substrato o amido a 1% em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, em uma temperatura de 60°C. A maior produção de amilases foi obtida no meio contendo a casca da batata doce como fonte de carbono, apresentando atividade enzimática de 24,79 U/mL. Os resultados mostraram-se comparáveis com os da literatura, o que instiga novas pesquisas com esta fonte carbono, que por constituir um resíduo de baixo custo e acessível, pode diminuir os custos de produção dessas enzimas em maiores escalas.

**Palavras-Chaves:** Biotecnologia; Fungos filamentosos; Amilases.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 210**

### **PROTEÍNA RECOMBINANTE LVBA-rechHTLV-1/2 COMO POTENCIAL FERRAMENTA DIAGNÓSTICA PARA OS VÍRUS HTLV-1/2**

FRANCO, G.M<sup>1,2</sup>; ROCHA, A.S<sup>1,2</sup>; MARTINS, M.L<sup>2,3</sup>; BARBOSA-STANCIOLI, E.F<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Virologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG.

<sup>2</sup> GIPH – Grupo Interdisciplinar de Pesquisas em HTLV.

<sup>3</sup> Setor de Pesquisa, Fundação HEMOMINAS. Belo Horizonte, MG.

Email: gabymelofranco@yahoo.com.br

O *Human T-lymphotropic virus* (HTLV) é o primeiro retrovírus de primata isolado em seres humanos e está associados a dois polos de adoecimento graves: neurodegenerativo e neoplásico. O Brasil é o país com maior número absoluto de indivíduos infectados no mundo, com triagem obrigatória nos hemocentros a partir de 1993. A situação do diagnóstico para HTLV no Brasil é agravada por tratar-se de uma infecção negligenciada, entretanto, de acordo com as novas políticas públicas e a necessidade de disponibilização de teste para a triagem do HTLV-1/2 nos serviços de saúde. Esse trabalho objetivou a produção de uma proteína quimérica multiepitopo com epitopos imunodominantes para o desenvolvimento de diagnóstico para ambos os vírus. A obtenção de produtos biotecnológicos nacionais com vistas à produção de sistemas diagnósticos para HTLV traz uma perspectiva de diminuição de custos e acessibilidade do mesmo a toda a população brasileira. A escolha dos epitopos foi baseada em moléculas mundialmente validadas em testes de ELISA e *Western blot*: Env e Gag, além da proteína Tax. A quimera foi produzida em *Escherichia coli* Rosetta-gami 2(DE3) e purificada no sistema *Äkta Start*. Em ensaios de *Western blot* utilizando pool de soros de indivíduos HTLV-1+, HTLV-2+ ou não infectados (coorte GIPH), e anticorpo monoclonal comercial anti-histidina, a proteína foi reconhecida de maneira específica. No ELISA indireto *in house*, com a quimera como fase sólida, foram testados soros de indivíduos HTLV-1+, HTLV-2+ e HTLV- da coorte GIPH, e HTLV-2 positivos de uma coorte de São Paulo e do Pará. A especificidade no reconhecimento da quimera foi observada com diferença estatística significativa ( $p<0,0001$ ) entre o grupo de indivíduos infectados (HTLV-1 e HTLV-2) e soronegativos. A análise de curva ROC apontou grande acurácia com área sobre a curva 0,9787. Conclui-se que a quimera LVBA-rechHTLV-1/2 possui grande potencial como antígeno para o desenvolvimento de sistemas diagnósticos para HTLV-1/2.

**Palavras chave:** HTLV-1, HTLV-2, diagnóstico, proteína quimérica, epitopo imunodominante

**Apoio financeiro:** CNPq, CAPES, FAPEMIG, PPSUS, PRPq-UFMG



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 211**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DO GENE A26L COMO SÍTIO DE RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA PARA CONSTRUÇÃO DE VACCINIA VIRUS WR RECOMBINANTES**

Henriques, LR<sup>1</sup>, Franco, GM<sup>1</sup>, Prado, JLC<sup>1</sup>, Barbosa-Stancioli, EF<sup>2</sup>, Fonseca, FG<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Discente do programa de pós graduação em Microbiologia, UFMG, Belo Horizonte, MG. <sup>2</sup>Professor Associado do departamento de Microbiologia, UFMG, Belo Horizonte. <sup>1,2</sup> Laboratório de virologia básica e aplicada

Email: henriques.lethicia@gmail.com

A tecnologia de construção de vetores poxvirais tem base na recombinação homóloga, que ocorre quando um plasmídeo contendo fragmentos de DNA de interesse, flanqueados por sítios de recombinação, é transfetado em células infectadas com um poxvirus selvagem. O gene A26L de VACV WR codifica uma proteína do envelope viral relacionada à fusão do vírus à membrana da célula hospedeira. Estudos sugerem que a deleção desse gene modifica a via de entrada do vírus na célula, não sendo prejudicial à sua replicação. O presente estudo visa avaliar o potencial do gene A26L como sítio de recombinação homóloga para construção de VACV WR recombinantes. Para tal, será construído um plasmídeo com base no vetor pNEB 193 contendo regiões homólogas a frações do gene A26L, clonadas em ambas as extremidades do sítio múltiplo de clonagem, e o gene codificador da proteína verde fluorescente (GFP), cuja expressão será utilizada para determinar o sucesso da transfecção. O GFP foi obtido a partir de restrição enzimática do plasmídeo pLW44 e clonado em pNEB 193. A clonagem foi confirmada por restrição. Visando a obtenção de regiões flanqueadoras, iniciadores internos ao gene A26L foram sintetizados e regiões de aproximadamente 450 pares de bases obtidas por PCR tendo o genoma isolado do vírus VACV WR como molde. Os fragmentos obtidos foram purificados e clonados individualmente em pGEM-T Easy e a presença dos insertos confirmada por restrição. Os plasmídeos contendo os fragmentos amplificados por PCR serão sequenciados. Após confirmação da identidade das regiões homólogas, seguir-se-á a obtenção dos insertos por restrição dos plasmídeos sequenciados e inserção no pNEB contendo GFP de modo a flanqueá-lo. O plasmídeo contendo os três elementos será transfetado em células BSC40 infectadas com VACV WR M.O.I. de 0,1. A expressão da proteína GFP determinará o sucesso da transfecção e indicará a eficiência do sítio A26L como sítio de recombinação homóloga para construção de VACV WR recombinantes.

**Palavras chave:** sítios de recombinação homóloga, poxvírus, vaccínia vírus, vírus recombinantes

**Apoio financeiro:** CNPq



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 212**

### **BUSCA DE EPITOPOS IMUNODOMINANTES PARA O DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DIAGNÓSTICO PRA OS VÍRUS HTLV-1 E HTLV-2**

FRANCO, G.M.<sup>1,2</sup>; ROCHA, A.S.<sup>1,2</sup>; COLOMBAROLLI, S.G.<sup>3</sup>; SILVA, C.E.C.<sup>3</sup>; MARTINS, M.L.<sup>2,4</sup>; BARBOSA-STANCIOLI, E.F.<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Virologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG.

<sup>2</sup> GIPH – Grupo Interdisciplinar de Pesquisas em HTLV.

<sup>3</sup> Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Instituto René Rachou - Fiocruz Minas

<sup>4</sup> Setor de Pesquisa, Fundação HEMOMINAS. Belo Horizonte, MG.

Email: gabymelofranco@yahoo.com.br

O *Human T-lymphotropic virus* (HTLV) é o primeiro retrovírus de primata isolado em seres humanos. O HTLV-1 é responsável por causar a leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL), mielopatia associada ao HTLV/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP), além de outros quadros inflamatórios importantes. O HTLV-2 apresenta alguns casos descritos de uma síndrome similar a HAM/TSP e associação a infecções bacterianas. O Brasil é o país com maior número absoluto de indivíduos infectados no mundo, sendo que a triagem para o HTLV-1/2 tornou-se obrigatória em 1993. Segundo o algoritmo ministerial, o diagnóstico deve ser realizado em duas etapas, a triagem sorológica e a confirmação sorológica ou molecular. Os resultados indeterminados são o ponto mais desafiador no diagnóstico das doenças infecciosas tanto pelo impacto nos diferentes segmentos da Saúde Pública, quanto pelo prejuízo psicológico que pode acarretar ao indivíduo em si. No caso do HTLV este quadro se agrava por tratar-se de uma infecção negligenciada em nosso país. A ocorrência dos mesmos indica a necessidade da melhoria dos testes atualmente utilizados. Sendo assim, este trabalho objetivou a busca por epitópos imunodominantes para o HTLV-1 e 2 para serem utilizadas no desenvolvimento de sistema diagnóstico para triagem e/ou confirmação da infecção viral. Para isso, 440 sequências brasileiras de Gag, Env e Tax de HTLV-1 e HTLV-2 depositadas no *GenBank* foram analisadas na plataforma *BepiPred* para verificar epitópos lineares de células B. Para HTLV-1 foram encontrados 11 epitópos de Gag, 9 de Env e Tax. Para HTLV-2 foram encontrados 11 epitópos de Gag e Env e 6 de Tax. Após análise quanto a similaridade em *ClustalOmega* encontraram-se três epitópos de Env e Gag de HTLV-1 e HTLV-2, três epitópos de Tax de HTLV-2 e quatro epitópos de Tax de HTLV-1 passíveis de serem utilizados na construção de quimeras para o desenvolvimento de testes específicos, capazes de diferenciar a infecção pelo HTLV-1 e HTLV-2.

**Palavras chave:** HTLV-1, HTLV-2, diagnóstico, proteína quimérica, epitópo imunodominante

**Apoio financeiro:** CNPq, CAPES, FAPEMIG, PPSUS, PRPq-UFMG



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 213**

**ANALYSIS OF COINFECTION OF DENGUE VIRUS IN A MAMMALIAN CELL MODEL**

Mendonça D.C<sup>1,2</sup>; Oliveira, L.C.<sup>1,2</sup>; Abrahão, J. S.<sup>2</sup>; Trindade, G. S<sup>2</sup>; Kroon, E. G.<sup>2</sup>; Bonjardim, C. A<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Transdução de Sinal;

<sup>2</sup>Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Email: dio128@ufmg.br/diogomendonca128@gmail.com

Co-circulation of arboviruses such as Dengue virus (DENV), Zika virus (ZIKV), Yellow Fever virus (YFV) and others has been a common occurrence in many endemic regions of Brazil. This far, there is no treatment or therapy approved to treat any of these aforementioned infections. In this context, the prospection of antivirals must be evaluated in models allowing the analysis of antiviral activity during co-infections. DENV is the most important arbovirus posing threat to public health worldwide. World Health Organization estimates that almost four hundred million people are infected every year. The disease is caused by infection with one of the four different serotypes (DENV1-4). Studies of Dengue co-infection are scarce and limited to mosquito cell lines thereby our proposal of a mammalian cell model more adequate for antiviral tests. Accordingly, VERO cells were co-infected with combinations of DENV serotypes and overlay media and co-infected monolayers were processed for qPCR with specific primers. Until the present moment, we successfully verified amplification of genomic segments of different DENV serotypes during co-infections in VERO cells. We were able to detect genome replication during co-infections with DENV serotypes 1 and 4, DENV serotypes 2 and 3, and DENV serotypes 3 and 4. We also did quantification and comparison of viral RNA of serotypes 3 and 4 between co-infected and individually infected samples and detected low variance in coinfecting samples, this results seems to indicate that are low interference in the genome replication between the two serotypes under this conditions, however additional data is necessary for confirmation, especially regarding the production of viable particles. Once we validate this model, we will be able to pursue antiviral studies during co-infections. We foresee that this strategy will provide insights on arboviruses-host interplay and ultimately therapy strategies that can be employed to counteract arboviruses.

**Keywords:** *Dengue virus, Coinfection, Vero cells*

**Financial support:** CNPq, CAPES e FAPEMIG



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 214**

**USO DE CAMUNDONGO C57BL/6 E COMO FERRAMENTA PARA ESTUDO DA BIOLOGIA BÁSICA, PATOGENIA E IMUNOLOGIA DO *Bovine alphaherpesvirus 5***

QUINTINO-DE-CARVALHO, I. L<sup>1</sup>; SILVA, D. G. <sup>2</sup>; GIANNATTASIO-FERRAZ, S<sup>1</sup>; RIBEIRO, L. S. <sup>1</sup>; DE OLIVEIRA, A. C. <sup>3</sup>; CAMPOS, M. A. S. <sup>4</sup>; SANTOS, B. S. A. S. <sup>4</sup>; RACHID, M. A. <sup>2</sup>; GUIMARÃES-DA-FONSECA, F. <sup>1</sup>; BARBOSA-STANCIOLI, E. F. <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia, ICB, UFMG. <sup>2</sup>Departamento de Patologia, ICB, UFMG. <sup>3</sup>Departamento de Farmacologia, ICB, UFMG. <sup>4</sup>Centro de Pesquisa René Rachou, Fiocruz, Minas Gerais.

O *Bovine alphaherpesvirus 5* (BoHV-5) é o agente causador de meningoencefalite não supurativa em bovinos. Coelhos, modelo caro e de difícil manejo, são utilizados para estudo dessa virose reproduzindo sinais clínicos verificados em bovinos. Apesar de vantajoso, o uso de camundongos para estudos da patogenia do BoHV-5 é incipiente e algumas linhagens não são susceptíveis ao vírus. Sabe-se, no entanto, que diferentes linhagens desses animais podem apresentar particularidades metabólicas e imunológicas que alteram sua susceptibilidade a patógenos. Assim, objetivamos avaliar a susceptibilidade de camundongos C57BL/6 à infecção por BoHV-5 inoculado via intracranial e utilizar uma cultura primária de células da glia derivadas de C57BL/6 neonatos para avaliação da multiplicação viral, do efeito citopático viral e de aspectos da resposta imune antiviral. Os camundongos infectados por BoHV-5 apresentaram sinais clínicos neurológicos e alterações histopatológicas cerebrais correspondentes às observadas em bovinos com quadros de meningoencefalite associada a esse vírus. As células da glia foram capazes de suportar a multiplicação viral alcançando títulos de  $2 \times 10^{5.57}$  e  $2 \times 10^{5.87}$  TCID50/mL em curvas de ciclo único e de múltiplos ciclos, respectivamente. A avaliação das células infectadas evidenciou a ocorrência de vacuolização, arredondamento celular e lise, e análises ultraestruturais de MET evidenciaram grandes grupos de partículas virais no citoplasma além de alterações nucleares. Avaliando a resposta imune antiviral utilizando qPCR foi verificada a expressão significativamente maior de TLR7, MyD88, IRF-3, IRF-7, IL1-β e IFN-β pelas células infectadas por BoHV-5, correspondente a um perfil de ativação de resposta antiviral típico de células do sistema nervoso central (CNS) *in vivo*. Esses dados indicam o potencial uso de camundongos C57BL/6 e de uma cultura primária obtida de seu CNS como ferramentas para estudo de aspectos da biologia básica, patogenia e imunologia do BoHV-5.

**Palavras chave:** *Bovine alphaherpesvirus 5*, camundongo C57BL/6, modelo animal.

**Apoio Financeiro:** CNPq, FAPEMIG e CAPES.



## **ÁREA: SAÚDE**

**Número: 215**

### **CONCENTRAÇÃO MINIMA INIBITÓRIA DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE AMORA PRETA E ERVA CIDREIRA FRENTE A CEPAS ISOLADAS DE *Staphylococcus aureus***

Baêta, J. V. P. B.<sup>1</sup>; Miranda, J. S.<sup>1</sup>; Nascimento, F. R<sup>1</sup>; Diaz, M. A. N.<sup>1</sup>; Pizziolo, V. R.<sup>1</sup> E

<sup>1</sup> Laboratório de química e bioquímica de produtos naturais, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais, Brasil. E-mail: [viktorbqi@gmail.com](mailto:viktorbqi@gmail.com)

O uso de plantas medicinais como remédios naturais é conhecido desde os tempos pré-históricos. Porém, grande parte destas plantas apresentam poucas informações publicadas sobre suas propriedades química, farmacológica e toxicológica. No Brasil, programas como a Relação Nacional de Plantas de Interesse ao Sistema Único de Saúde e o Componente Verde da rede Farmácia de Minas têm como objetivo incentivar pesquisas na área de plantas medicinais, estabelecendo o uso correto e seguro dessas e de fitoterápicos. Muitas propriedades antimicrobianas das plantas tornam-se uma alternativa frente à resistência a antibióticos de muitos microrganismos. O objetivo deste trabalho foi determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de extratos etanólicos das folhas da amoreira-preta (*Morus nigra*) e erva cidreira (*Melissa officinalis*) no combate de estirpes de *Staphylococcus aureus* (3008, 3828, 3917, 4157 e 4182), cedidas pela Embrapa/CNPGL - Juiz de Fora – MG. A obtenção dos extratos foi através da maceração exaustiva e posterior uso de um rota evaporador para a concentração do extrato. Para a determinação CIM foi utilizado o método de microdiluição em caldo BHI. Para as colônias, foi regulado a concentração  $10^6$  UFC/mL e adicionou-se concentrações do extrato variando de zero até 10 mg/mL. O controle negativo foi constituído apenas por uma suspensão bacteriana e o positivo, uma suspensão bacteriana e antibiótico. As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 h, posteriormente corada com MTT a 3 mg/mL e deixando em incubação a 37°C por 1 h. A CIM foi definida pela menor concentração do extrato no qual visualmente não se observa mudança da coloração. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. O extrato de *M. officinalis* apresentou um CIM de 2,5 mg/mL, enquanto o extrato de *M. nigra* apresentou CIM de 0,625 mg/mL para todas as cepas testadas. Estes resultados apontam o potencial antibacteriano frente a estes microrganismos, sendo que o extrato de *M. nigra* mostrou-se mais promissor.

**Palavras-chave:** Extrato etanólico. Produtos Naturais. *Staphylococcus aureus*.

**Apoio Financeiro:** CNPq, CAPES E FAPEMIG



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 216**

### **MASTITES BOVINAS CAUSADAS POR MICOPLASMAS**

BRITO, R.F.<sup>1</sup>; VALENTE, G.L.C.<sup>1</sup>; de QUAY, A.A.<sup>1</sup>; DIAS, R.G.<sup>1</sup>; SILVA, T.M.L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, Escola de veterinária, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: rommelf@hotmail.com

Mastite bovina (MB) é a inflamação da glândula mamária em resposta à infecção por microrganismos, como *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Mycoplasma* spp. e coliformes. É a doença mais comum e dispendiosa em rebanhos leiteiros, devido à redução do volume e qualidade do leite, custos com prevenção e tratamento, descarte de vacas infectadas e mortalidade. O objetivo da revisão foi abordar as características e importância de MB causadas por *Mycoplasma* spp. A primeira ocorrência de MB por micoplasmas foi relatada em 1962, contudo no Brasil há poucos relatos. Porém, acredita-se que o patógeno é de grande importância epidemiológica no país, já que a principal forma de introdução no rebanho é pela aquisição de novos animais, prática comum na pecuária brasileira. A transmissão de MB por micoplasmas ocorre pelas mãos de ordenhadores, equipamentos de ordenha e utilização múltipla de seringas intramamárias. Vacas portadoras podem eliminar o agente pelo leite sendo essa uma fonte de infecção intermitente. Também há a possibilidade da transmissão do agente entre quartos mamários do mesmo animal via corrente sanguínea. A infecção causa queda súbita da produção do leite, aumento nas contagens de células somáticas ( $>10^6$  células/mL) e contagens bacterianas ( $10^5$ - $10^8$  UFC/mL). Devido à alta resistência do agente a antimicrobianos, o controle de MB causada por *Mycoplasma* spp. consiste na detecção (isolamento em ágar Hayflick), segregação e descarte de animais positivos, evitando a propagação pelo rebanho. A prevenção é feita a partir da higiene de ordenha, pre-dipping e pós-dipping, desinfecção dos equipamentos de ordenha. A realização de testes de detecção do patógeno antes da compra de animais e quarentena torna-se necessárias para reduzir o risco de introdução de *Mycoplasma* spp. na propriedade. Conclui-se que é preciso detectar precocemente os casos de MB por *Mycoplasma* spp. a fim de manter a qualidade do leite e a sanidade do rebanho, além de evitar perdas econômicas.

**Palavras chave:** Mastite, micoplasmas, leite.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 217**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DO EXTRATO AQUOSO DE *Allium sativum* FRENTE À CEPA DE *Staphylococcus aureus* (ATCC12600)**

Carvalho,E.P.S<sup>1</sup>; Oliveira,J.M<sup>1</sup>; Santos, T.A<sup>1</sup>; Vieira,A.A.S<sup>2</sup>; Avelar, D.M<sup>2</sup>

1. Graduandos – Ciências Biológicas / Centro Universitário UNA – BETIM/MG; 2. Docente / Centro Universitário UNA – BETIM/MG

**RESUMO**

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o possível efeito antimicrobiano do extrato aquoso do alho em *Staphylococcus aureus*. O *S. aureus* é uma bactéria Gram-positivo presente na microbiota natural humana e é considerada uma das espécies de maior interesse no quadro das infecções devido sua enorme capacidade de adaptação e resistência. O uso indiscriminado de antibióticos fez com que essas bactérias se tornassem resistentes, sendo necessário a busca por alternativas que inibam o crescimento bacteriano, dentre eles vegetais considerados medicinais, como o *Allium sativum* (alho), pois no bulbo desta planta é produzido a alicina responsável pela sua atividade antimicrobiana. O experimento foi realizado através da técnica de difusão em meio sólido, conforme o método de Kirby-Bauer e para a produção do extrato, os bulbilhos foram triturados em um processador para obter diluições aquosas de 1:1 e 1:10. Os resultados não mostraram o efeito antimicrobiano desta planta na metodologia utilizada. Assim é necessário que novos experimentos sejam realizados, utilizando outras formas de metodologia, para que o efeito antimicrobiano desta planta seja realmente comprovado nesta espécie.

**Palavras – chave:** *Allium sativum*; *Staphylococcus aureus*; efeito antibacteriano; extrato aquoso.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 218**

**PERSPECTIVAS DO DIAGNÓSTICO DA FEBRE MACULOSA NO BRASIL E NO MUNDO.**

Faria, V. C. S.<sup>1</sup>; Brito, N. C.<sup>2</sup>; Freire, M. L.<sup>2</sup>; Carvalho, P. I. A.<sup>3</sup>; Lana, M.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.<sup>2</sup>Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, MG, Brasil. <sup>3</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil. Email: [veronica.faria@hotmail.com](mailto:veronica.faria@hotmail.com)

Febre maculosa é a doença infecciosa transmitida por carrapatos que provoca maior número de mortes no mundo. O diagnóstico é basicamente clínico-epidemiológico e se confunde com doenças que possuem manifestações clínicas semelhantes, além disso, o teste laboratorial confirmatório é tardio. Testes diagnósticos com elevado desempenho são essenciais para o rápido e preciso diagnóstico da doença. O objetivo deste trabalho foi identificar os testes registrados no Brasil e disponíveis em outros países, além de descrever estudos que vêm sendo realizados mundialmente. Por meio de descritores específicos, uma busca foi realizada na ANVISA e em diferentes bases de dados (PubMed, LILACS e IBECS). Na ANVISA, foram localizados sete kits com registros vigentes, sendo um específico para detecção de anticorpos IgG anti-*Rickettsia rickettsii* (IFA), fabricado pela *Scimedx Corp./EUA* com 93% de sensibilidade e 76% de especificidade. Em outros países foram encontrados a utilização de seis kits, sendo três ensaios imunoenzimáticos e três baseados na imunofluorescência indireta (IFI). Destes, apenas uma IFI é espécie-específica, fabricado pela *Fuller Lab./EUA*. Não foram encontrados dados de desempenho dos testes utilizados em outros países. A busca para encontrar tecnologias que vêm sendo utilizadas identificou estudos baseados na biologia molecular, que descreveram qPCR, sendo um deles multiplex, para a detecção de três espécies do gênero *Rickettsia*. Este ensaio foi específico no resultado, sem falso-positivos e demonstrou maior sensibilidade comparada a PCR convencional. Em resumo, os ensaios de qPCR apresentaram melhor desempenho na detecção da *R. rickettsii*. São escassos os estudos para fins de diagnóstico e a pesquisa de proteínas (rOmpA, rOmpB, A1G-01780) tem sido realizada para desenvolvimento de vacinas. Como o usual diagnóstico não é eficiente na fase aguda da doença, o desenvolvimento de novos ensaios e a utilização de testes moleculares passa a ser necessária na prática clínica.

**Palavras-chave:** Febre maculosa, diagnóstico, *Rickettsia rickettsii*.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 219**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DO EXTRATO LIOFILIZADO DE KEFIR SOBRE CULTURAS DE *Listeria monocytogenes***

Lara Júnior, C. R.<sup>1</sup>; Mendes, G. <sup>1</sup>; Costa, E. C. <sup>1</sup>; Oliveira, R. B. P<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: [celiolarajr@gmail.com](mailto:celiolarajr@gmail.com)

O kefir é uma bebida láctea obtida pela fermentação do leite ou água por grãos de kefir, que são formados por uma matriz de polissacarídeos que possui uma mistura de diversos microrganismos, dentre eles leveduras, bactérias acéticas e bactérias lácticas. Essas últimas apresentam conhecido potencial probiótico. O kefir é considerado um alimento probiótico natural, com ação contra microrganismos patogênicos. *Listeria monocytogenes* é um patógeno alimentar ubíquo, que pode contaminar alimentos. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antimicrobiano do extrato liofilizado em comparação ao extrato natural da bebida kefir sobre culturas de *L. monocytogenes* sorotipo 4b(ATCC 19115). Para obtenção dos extratos, o leite fermentado pelos grãos de kefir foi centrifugado e filtrado em membranas de 0,45µm de poro. O sobrenadante foi submetido à liofilização. O liofilizado foi armazenado em dessecador e posteriormente foi submetido ao teste de atividade antimicrobiana pela metodologia de poço-difusão em placas. Foram observados halos de inibição em todas as diluições de *L. monocytogenes* testadas. A média do diâmetro desses halos foi de  $8,18 \pm 2,02$  mm e  $5,76 \pm 1,33$  mm ( $p < 0,01$ ) para o teste com o extrato liofilizado e o extrato natural, respectivamente. O processo de liofilização aumentou a atividade antimicrobiana, pela concentração dos compostos bioativos sem, contudo, alterar sua característica bioquímica. Além disso, possibilitou seu armazenamento sem refrigeração. Novos estudos devem ser conduzidos para verificar a viabilidade da aplicação desse extrato liofilizado como conservante em alimentos.

**Palavras-chave:** liofilização, inibição, difusão em poço, conservação de alimentos, probióticos.



## RESUMOS

Número: 220

### AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ALECRIM, PIMENTA E GENGIBRE EM CEPAS DE *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella oxytoca* E *Escherichia coli*

Parreira, D.S.F.<sup>1\*</sup>; Resende, J.C.P.<sup>1</sup>; Saraiva, I.S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Betim, MG, Brasil. \*denner.samuel@hotmail.com

Com o aumento da seleção de bactérias resistentes a antibacterianos, os óleos essenciais estão se tornando uma alternativa promissora no combate a diversos patógenos. Por causa de suas propriedades medicinais, diversas plantas estão sendo objeto de estudo devido aos princípios ativos presentes nas substâncias produzidas em seu metabolismo secundário. Por serem extremamente concentrados, alguns óleos essenciais atuam como bacteriostáticos potentes, inibindo o crescimento de bactérias resistentes a antibióticos. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a ação bactericida dos óleos essenciais de: *Rosmarinus officinalis*, *Capsicum annum* e *Zingiber officinale* sobre cepas de bactérias pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais de: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella oxytoca* e *Escherichia coli*. Através do método de difusão em ágar, foram aplicados quatro discos de papel filtro estéreis na superfície de cada placa previamente inoculada. Cada disco de papel filtro recebeu as seguintes concentrações de óleos essenciais: 10, 20, 30 e 40µl, utilizando micropipeta automática. Foi observado a eficiência antimicrobiana desses óleos através de uma análise qualitativa de presença/ausência de um halo inibidor. O óleo de alecrim foi o que apresentou maior atividade antibacteriana contra as cepas de *S. aureus* e *K. oxytoca* a partir das concentrações de 20 e 10µl respectivamente. Enquanto que os de pimenta e gengibre não apresentaram nenhum halo inibidor nas concentrações testadas. As variações dos resultados podem ser justificadas devido as diferentes formas de resistência entre as linhagens de bactérias, além das variações das concentrações dos compostos ativos presentes nos óleos. Contudo novos estudos devem ser realizados utilizando diferentes óleos e concentrações, ampliando o conhecimento sobre a ação dos óleos essenciais para o auxílio no tratamento de doenças bacterianas.

**Palavras Chave:** Óleos Essenciais, Bactericidas, *Rosmarinus officinalis*, *Capsicum annum* e *Zingiber officinale*.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 221**

**ATIVAÇÃO DO RECEPTOR DE HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS CONTROLA A EXPANSÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE INDOL E PROTEGE CAMUNDONGOS DA COLITE ULCERATIVA INDUZIDA POR DSS**

Batista, R.R.A.<sup>1,2</sup>; Fagundes, M.<sup>1,2</sup>; Souza, D.G.<sup>1</sup>; Teixeira, M.M.<sup>2</sup>; Fagundes C.T.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. <sup>2</sup>Laboratório de Interação Microrganismo-Hospedeiro, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. E-mail: [rafaribeiroab@gmail.com](mailto:rafaribeiroab@gmail.com)

Os compostos indólicos podem ser sintetizados pela microbiota indígena a partir do triptofano e promover a ativação do receptor de hidrocarbonetos aromáticos (AhR), que contribui para a homeostase intestinal. O objetivo deste estudo foi determinar se a produção de compostos indólicos pela microbiota intestinal e consequente ativação de AhR desempenha papel protetor durante a colite ulcerativa experimental. A produção desses compostos indólicos nas fezes foi dosada usando-se o reagente de Ehrlich. Animais selvagens e AhR<sup>-/-</sup> foram expostos a Dodecil Sulfato de Sódio (DSS) a 2% p/v por 9 dias e acompanhados para avaliação do peso corporal, escore clínico, unidades formadoras de colônias de enterobactérias e dosagem de IgG e IgM total nas fezes. As colônias de enterobactérias presentes nas fezes dos animais com colite foram isoladas para posterior identificação presuntiva utilizando o teste Rugai modificado. Observou-se que há o aumento da produção de compostos indólicos nos dias iniciais da colite. Ainda, animais AhR<sup>-/-</sup> apresentaram aumento significativo do escore clínico a partir do terceiro dia de indução da colite, com marcante perda de peso, quando comparado com os animais selvagens e 100% de taxa de letalidade. Apesar da maior susceptibilidade, não houve diferenças na expansão do conteúdo de enterobactérias entre os dois genótipos e encontrou-se maiores títulos de IgG e IgM total nas fezes nos animais AhR<sup>-/-</sup>. No entanto, houve expansão de *Escherichia coli* nas fezes de animais AhR<sup>-/-</sup>, espécie de enterobactéria produtora de compostos indólicos. Nos animais selvagens, houve expansão de *Enterobacter spp.*, bactéria não produtora de indol. Portanto, animais AhR<sup>-/-</sup> são mais susceptíveis à colite ulcerativa, o que sugere o efeito protetor do indol contra a doença. A expansão de bactérias produtoras de indol nos animais AhR<sup>-/-</sup> sugere que a ativação de AhR é importante para controlar a expansão dessas bactérias durante a disbiose induzida pela colite ulcerativa.

**Palavras-chave:** Compostos indólicos, AhR, Microbiota, Disbiose, Colite ulcerativa.

**Apoio financeiro:** PRPq-UFMG, CNPq, INCT-Dengue e CAPES.



## **RESUMOS**

**Número: 222**

### **AVALIAÇÃO SANITÁRIA DE *Amazona aestiva* EM CATIVEIRO PARA REINTRODUÇÃO**

Coelho, H. L.G.<sup>1</sup>; Mureb, E. N.<sup>2</sup>; Pinto, P. N.<sup>2</sup>; Medeiros, L. B.<sup>2</sup>; Sebastiani, M. C.<sup>2</sup>; Silva, A. S. G.<sup>3</sup>; Costa, C. S.<sup>1</sup>; Buiatte, A. B. G.<sup>4</sup>; Marín-Gómez, S. Y.<sup>5</sup>; Martins, N. R. S.<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Graduanda em Medicina Veterinária da Escola de Veterinária da UFMG; <sup>2</sup> Programa de Residência Integrada em Medicina Veterinária da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais; <sup>3</sup> Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais <sup>4</sup> Programa de Residência Uniprofissional em Medicina Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia; <sup>5</sup> Prof. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG. E-mail: [hcoelho.vet@gmail.com](mailto:hcoelho.vet@gmail.com)

A avaliação sanitária de aves destinadas à reintrodução é necessária, devido à possibilidade de transferência de agentes infecto-parasitários adquiridos em triagem, que podem representar importante impacto no ambiente natural, especialmente se livre de doença. Investigou-se a ocorrência de *Chlamydia psittaci*, *Mycoplasma* sp. e *M. gallisepticum*, *Aviadenovirus* e vírus da doença do bico e das penas (BFDV), e realizou-se a sexagem dos papagaios verdadeiros (*Amazona aestiva*), destinados à soltura, oriundos de Centros de Triagem de Animais Silvestres (CETAS), de Minas Gerais e Piauí. Foram analizados 117 papagaios verdadeiros com e sem sinais clínicos. Amostras (n=86) de swabs (cloacal, traqueal e ocular) foram submetidas à extração de DNA por método de fervura e, em seguida, direcionadas para reação em cadeia pela polimerase (PCR), para avaliar ocorrência de *Mycoplasma* sp., *M. gallisepticum* e *C. psittaci*. Para *Aviadenovirus*, BFDV e para a sexagem, foram utilizadas 72 amostras de sangue com anticoagulante, e submetidas à extração por sílica. Os resultados demonstram a presença da região do DNA que codifica a proteína da membrana externa (*ompA*) de *C. psittaci* em 18,6% (16/86) das aves. A região do DNA de *Mycoplasma* sp. que codifica a região intergênica 16S-23S do RNA ribossomal foi encontrada em 3,63% (2/55). Estas aves foram retestadas e nenhuma foi positiva para *M. gallisepticum* (região que codifica a citoadesina-*mgc2*). A região do DNA de *Aviadenovirus* (região que codifica o *hexon*) foi encontrada em 34,72% (25/72). A região do DNA de BFDV (que codifica vp1) foi encontrada em 20% (11/55) das aves. Dos psitacideos sexados, 62% (18/29) eram fêmeas e 37% (11/29) eram machos. Estes resultados evidenciaram a presença de agentes infecciosos em *A. aestiva* em triagem. Considerando a reintrodução, ressalta-se a necessidade de adoção de protocolos de avaliação sanitária pré-soltura, a fim de minimizar os riscos de introdução de agentes causadores de doenças.

**Palavras-chave:** *Amazona aestiva*, *Aviadenovírus*, BFDV, *Chlamydia psitaci*, doença do bico e das penas, IBAMA, IEF, *Mycoplasma* sp., *Mycoplasma gallisepticum*, PCR.

**Apoio Financeiro:** CAPES, CNPq, FAPEMIG, IBAMA, IEF, Waita.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 223**

**PROSPECÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS E SINTÉTICOS CONTRA *Acinetobacter baumannii***

Lima, W.G.<sup>1</sup>; Cruz, W.S.<sup>1,2</sup>; Nascimento, L.A.A.<sup>1</sup>; Palumbo, J.M.C.<sup>1</sup>; Ferreira, J.M.S.<sup>1</sup>, Magalhães, J.C.<sup>2</sup>; Soares, A.C.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia Médica, UFSJ, Divinópolis, MG. <sup>2</sup>Laboratório de Biologia Molecular e Celular, Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos (DQBIO), UFSJ, Ouro Branco, MG.

<sup>3</sup>Laboratório de Farmacologia da dor e Inflamação, UFSJ, Divinópolis, MG. #williamgustavofarmacia@hotmail.com.

*Acinetobacter baumannii* é um cocobacilo Gram-negativo comum em infecções nosocomiais. Sua capacidade em desenvolver resistência aos antibióticos é notável, sendo que em algumas partes do mundo 45-85% dos isolados de *A. baumannii* apresentam o fenótipo multirresistente. Esse panorama desafia a eficácia da terapia antibacteriana nessa espécie, estimulando, assim, o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Sendo assim, o presente trabalho objetivou a prospecção farmacológica de compostos naturais e sintéticos contra *A. baumannii*. Uma quimioteca de 43 compostos (41 sintéticos e 2 naturais) foi empregada neste estudo. A atividade antibacteriana foi determinada pela concentração inibitória mínima (CIM) segundo o método de microdiluição em caldo. Os compostos ativos foram selecionados para a determinação da: (i) atividade bactericida, pela avaliação da concentração bactericida mínima (CBM); e (ii) avaliação da citotoxicidade nas linhagens de células Vero ATCC CCL-81 e BHK ATCC CCL-10. Cloranfenicol/Amoxicilina e DMSO foram empregados como controle positivo e negativo, respectivamente. Dentre os compostos, 7 apresentaram atividade antibacteriana no ensaio preliminar, os quais: B<sup>acr</sup> e B<sup>her</sup> (CIM 250 µg/mL); Bp<sup>her</sup> (CIM 125 µg/mL); Bp<sup>acr</sup> (CIM 62,5 µg/mL); Bp<sup>prr</sup>, Bp<sup>bur</sup> e Bp<sup>var</sup> (CIM 31,2 µg/mL). Os compostos Bp<sup>prr</sup>, Bp<sup>bur</sup> e Bp<sup>var</sup> foram 8 vezes mais ativos que o cloranfenicol (CIM 250 µg/mL) e 4 vezes mais potentes que a amoxicilina (CIM 125 µg/mL), além de serem bactericidas (CBM 250 µg/mL). Adicionalmente, esses três compostos apresentaram baixa citotoxicidade frente às células Vero e BHK com valores de CC<sub>50</sub>>100 µg/mL em ambas. Em conclusão, os compostos Bp<sup>prr</sup>, Bp<sup>bur</sup> e Bp<sup>var</sup> destacam-se como potenciais protótipos de antibióticos contra *A. baumannii* por apresentarem considerável atividade antibacteriana e baixa toxicidade *in vitro*.

**Palavras-Chaves:** Atividade antibacteriana, *Acinetobacter baumannii*, citotoxicidade.

**Apoio financeiro:** FAPEMIG e CNPq.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 224**

### **AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL E FENÓTIPOS RELACIONADOS EM UM MODELO ANIMAL DE CONSUMO DE DIETA RICA EM GORDURAS E ETANOL**

Moreira Junior, R.E.<sup>1</sup>; Carvalho, L.M.<sup>1</sup>; Ferreira, R.M<sup>1</sup>; Pedersen, A.S.B<sup>1</sup>; Sartori, B.M<sup>1</sup>; Godard, ALB<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Genética Animal e Humana, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG.  
E-mail: [renatoe@ufmg.br](mailto:renatoe@ufmg.br)

O intestino é um ecossistema complexo em que diferentes espécies de bactérias têm que competir e colaborarumas com as outras e com as células do seu hospedeiro para sobreviver e se multiplicar. Essas bactérias fazem parte da microbiota intestinal, cujo papel é essencial para os mamíferos, uma vez que desempenham diversas funções associadas a saúde e a doença. Diversos estudos mostram que a ingestão de determinados alimentos, como os ricos em gorduras, e o consumo de drogas, como o etanol, afetam diretamente a composição e abundância da microbiota. Com base nessas informações o presente projeto tem como objetivo quantificar os principais filos da microbiota intestinal em um modelo animal de consumo de dieta rica em gorduras e etanol. Ademais, procuramos relacionar alterações na microbiota com os fenótipos desenvolvidos no modelo. Para atingir nosso objetivo, 28 camundongos C57BL/6 foram submetidos às seguintes etapas: (E1) Ambientação, por 1 semana; (E2) Tratamento dietético, por 8 semanas, na qual, 14 animais receberam a dieta rica em gorduras *high sugar and butter* (grupo HSB) e 14 animais a dieta padrão (grupo AIN93G); (E3) Consumo de etanol, na qual, os animais foram submetidos por 4 semanas ao consumo de etanol por livre escolha, sendo divididos em 4 grupos: [1] AIN93G + H<sub>2</sub>O (n=7), [2] AIN93G + EtOH (n=7), [3] HSB + H<sub>2</sub>O (n=7) e [4] HSB + EtOH (n=7). As fezes para extração do DNA bacteriano para quantificação absoluta por PCR em tempo real foram coletadas ao final das etapas E1, E2 e E3. Durante o experimento, foram determinados os seguintes fenótipos nos animais: peso, consumo de etanol, preferência pelo etanol, consumo dietético, adiposidade, colesterol total, glicose e triglicerídeos. Como resultado, foi observada a influência da microbiota intestinal no ganho de peso e no desenvolvimento de alterações que podem levar a condições que se assemelham a síndrome metabólica e obesidade nos animais do grupo HSB, sendo que o etanol parece exacerbar tais efeitos.

**Palavras Chave:** Microbiota Intestinal. Dieta Rica em Gordura. Etanol. Ganho de Peso.

**Apoio Financeiro:** FAPEMIG; CNPQ



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 225**

### **AVALIAÇÃO DO EFEITO PROBIÓTICO DE *Escherichia coli* NISSLE 1917 EM MODELO EXPERIMENTAL DE MUCOSITE INDUZIDA PELO QUIMIOTERÁPICO CLORIDRATO DE IRINOTECANO**

Souza, E.L.S.<sup>1</sup>; Brightenti, G.M.<sup>1</sup>; Santos, S.S.<sup>1</sup>; Damasceno, Q.S.<sup>1</sup>; Trindade, L.M.<sup>2</sup>; Generoso, S.V.<sup>2</sup>; Cardoso, V.<sup>2</sup>; Martins, F.S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Agentes Bioterapêuticos, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. <sup>2</sup>Laboratório de Radioisótopos, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: ericalorenna@hotmail.com

A quimioterapia e a radioterapia são contextos terapêuticos amplamente utilizados na atualidade em decorrência do aumento expressivo nos casos de câncer. Entretanto, é reconhecido que terapêuticas antitumorais estão associadas a efeitos colaterais significativos, podendo interromper o curso do tratamento. A mucosite é um destes efeitos, sendo caracterizada por um processo inflamatório que acomete porções do trato gastrointestinal. A administração do cloridrato de irinotecano, pró-droga administrada principalmente no tratamento do câncer colorretal, está relacionada à ocorrência de mucosite nos pacientes. Acredita-se que seu metabolismo envolva a participação de bactérias intestinais, sendo que algumas alternativas terapêuticas têm sido propostas para contornar este evento e viabilizar a administração do irinotecano com menor incidência de efeitos citotóxicos. Uma delas é o uso de antibióticos. No entanto, ao seu uso se opõe questões essenciais como a resistência bacteriana. Novas estratégias terapêuticas tornam-se necessárias. Dessa forma, o objetivo deste trabalho é testar o papel do agente bioterapêutico Mutaflor®, *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN), em modelo experimental de mucosite. Para isso estão sendo utilizados fêmeas de camundongos Balb/c com mucosite induzida por cloridrato de irinotecano em três injeções intraperitoneais na dose de 75 mg/kg de peso corpóreo. O probiótico está sendo administrado diariamente por meio de inóculo de  $10^8$  células por via intragástrica, nos modelos preventivo e curativo. Os seguintes parâmetros estão sendo analisados: variação percentual do peso, consumo de ração, composição da microbiota intestinal, translocação bacteriana para o fígado, perfil de resposta imune e permeabilidade intestinal. Os dados obtidos serão analisados pelo software GraphPad Prism e os valores com  $p < 0,05$  serão considerados significativos.

**Palavras-chave:** cloridrato de irinotecano, mucosite, câncer colorretal, probiótico, *Escherichia coli* Nissle 1917.

**Apoio Financeiro:** CNPq, CAPES, FAPEMIG.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 226**

**CARACTERIZAÇÃO DO MICROBIOMA GÁSTRICO DE SUÍNOS COM E SEM  
ÚLCERA DA PARS ESOPHAGEA**

Almeida, L.R.<sup>1</sup>, Fernandes, G.R.<sup>3</sup>, Dias, M.F.<sup>1</sup>, Carmo, A.O.<sup>1</sup>; Nascimento, A.M.A.<sup>1</sup>, Nicoli, J.R.<sup>1</sup>, Rocha, G.A.<sup>2</sup>, Queiroz, D.M.M.<sup>2</sup>, Moura, S.B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG), <sup>2</sup>Faculdade de Medicina da UFMG (Av. Alfredo Balena 190/216, Belo Horizonte, MG), <sup>3</sup>Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz (Av. Augusto de Lima 1715, Belo Horizonte, MG). E-mail: lramos\_almeida@yahoo.com.br

A microbiota associada ao trato gastrointestinal do homem e de animais tem profunda influência sobre o estado de saúde do hospedeiro. Entretanto, a microbiota gástrica tem sido pouco explorada. Foi caracterizada, por metagenômica, a composição da microbiota presente na mucosa gástrica de suínos com e sem úlcera da *pars esophagea*. Fragmentos de antro, corpo e *pars esophagea* de 16 estômagos (8 com úlcera e 8 sem úlcera) foram obtidos para extração de DNA total, amplificação da região V4 do rDNA 16S e sequenciamento utilizando a plataforma Illumina MiSeq. As regiões com baixa qualidade foram podadas e uma janela deslizante de 4 bases com média de qualidade 15 foi critério de corte. Os pares de sequências filtradas foram concatenados para formarem uma sequência única representando o amplicon. O conjunto de todas as sequências foi derreplicado e selecionadas as sequências que estavam representadas mais que uma vez. As sequências únicas foram associadas a um taxon utilizando o script assign\_taxonomy do Qiime e o banco de dados GreenGenes 13.5. Três filos bacterianos foram predominantes na mucosa gástrica de suínos: Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria, sendo que Actinobacteria e Proteobacteria foram mais abundantes no grupo com úlcera. No grupo normal, Firmicutes predominou sobre os outros filos, entretanto, houve um número extremamente elevado de sequências não classificadas, que precisam ser investigadas. Outra diferença encontrada foi com relação ao índice de diversidade Shannon que foi maior em estômagos com úlcera ( $p = 0,002$ ). Análises das comunidades bacterianas no nível de gênero mostraram que *Arthrobacter* e *Enterococcus* foram mais abundantes na condição ulcerosa, enquanto que estômagos sem úlcera apresentaram predomínio de *Prevotella* e *Veillonella*. As alterações encontradas tanto na abundância quanto na diversidade das comunidades bacterianas podem ter importante papel ainda não relatado na patogênese da úlcera da *pars esophagea* de suínos.

**Palavras-chaves:** Microbioma; mucosa gástrica; suínos; úlcera da *pars esophagea*  
**Apoio financeiro:** CAPES e CNPq



**Número: 227**

**ALVEOLARY BONE LOSS INDUCED BY SEPTIC ARTHRITIS IN VIVO**

Felipe Henrique Silva Bambirra<sup>1</sup>, Ian Meira Chavez<sup>1</sup>, Daiane Boff<sup>2</sup>, Vivian Louise Soares de Oliveira<sup>2</sup>, Daniele Glória Souza<sup>1</sup>, Mauro Martins Teixeira<sup>2</sup>, Flávio Almeida Amaral<sup>2</sup>, Mila Fernandes Moreira Madeira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia - Instituto de Ciências Biológicas (ICB) - UFMG; <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica e Imunologia – ICB – UFMG

Email: iandemeirachaves@hotmail.com

Periodontal disease (PD) is an inflammatory condition of infectious etiology that affects the supporting structures of teeth. It has been demonstrated that inflammatory arthritis induced in mice is related to alveolar bone loss, characteristic of PD. Septic arthritis (SA) is an infective condition of joints, mainly associated to *Staphylococcus aureus* that results in tissue damage. CCL2 chemokine is known to be involved in the recruitment of monocytes in inflammatory context. This study aims to investigate the relationship between SA and associated alveolar bone loss, evaluating the role of the CCR2 receptor, which plays a predominant role in osteoclastogenesis process, found in PD. We use an in vivo evaluation to reproduce a pathological condition similar to that occurring in humans. This will enable an investigation into the immunological and microbiological mechanisms involved in this complex relationship, in addition to intensifying the knowledge of the role of CCR2 in another type of arthritis. SA was induced by intra-articular inoculation of *S. aureus* ATCC 6538 ( $1 \times 10^7$  CFU/mL in PBS) in the knee of C57B6/J (WT) or *Ccr2<sup>-/-</sup>* mice. The control received only PBS. Seven days later, the mice were euthanized and the joint and maxillary tissues were removed and processed for histopathological score, measurement of alveolar bone loss, neutrophil infiltration (MPO) and cytokine production (ELISA). SA resulted in significant inflammatory cell infiltrate in the knee of both groups, but it was significantly decreased in the absence of CCR2. A significant alveolar bone loss was observed in infected WT mice. However, in *Ccr2<sup>-/-</sup>* mice, with lower histopathological score in the infected knee, no significant alveolar bone loss was observed. In addition, WT mice showed higher production of RANKL relative to OPG than *Ccr2<sup>-/-</sup>* mice. These results partially indicate that SA is associated with alveolar bone loss in mice and CCR2 may play an important role in controlling this relationship.

**Key words:** periodontal disease, septic arthritis, alveolar bone loss, dysbiosis and chemokine.

**Financial Support:** CNPq, CAPES and FAPEMIG.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 228**

**POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE FRAÇÕES DE *Aspidosperma subincanum*.**

Carneiro, M. F. C. F.<sup>1</sup>; Campana, P. R. V.<sup>1</sup>; Silva, C. G.<sup>1</sup>; Scoaris, D. O.<sup>1</sup>; Silva, A. F.<sup>2</sup>; Almeida, V. L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Serviço de Fitoquímica e Prospecção Farmacêutica; Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil; <sup>2</sup>Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. E-mail: maria.carneiro@funed.mg.gov.br

O aumento da resistência bacteriana aos fármacos disponíveis tem trazido desafios à medicina moderna, fazendo-se necessário a pesquisa de novos agentes antimicrobianos. Espécies vegetais têm sido avaliadas quanto a esse potencial antimicrobiano, visando a obtenção de novas substâncias bioativas como estratégia na busca de alternativas terapêuticas. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana de frações de *Aspidosperma subincanum*, comumente utilizada como agente antimalárico e no tratamento de hipercolesterolemia e diabetes por comunidades tradicionais. Para essa análise, a planta foi coletada no cerrado brasileiro. As folhas foram moídas e posteriormente extraídas por percolação utilizando EtOH:H<sub>2</sub>O (8:2). O extrato foi liofilizado e particionado com solventes de diferentes polaridades obtendo-se as seguintes frações: acetato de etila, butanol, diclorometano, hexano e metanol. Essas frações e o extrato liofilizado foram submetidos à análise da atividade antibacteriana pela técnica de microdiluição em caldo, frente *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 11775) segundo CLSI/NCCLS (2003), com adaptações. Considerou-se ativas as amostras que apresentaram porcentagem de inibição do crescimento microbiano acima de 70%. Das 6 amostras avaliadas, a fração de diclorometano demonstrou atividade antibacteriana promissora frente a *E. coli* e *S. aureus*, com porcentagem de inibição de 100% ± 4,90 e 100% ± 3,08, respectivamente. Estes resultados indicam potencial antibacteriano positivo da amostra da fração de diclorometano frente a Gram-negativos e a Gram-positivos. Faz-se necessário o isolamento e identificação da(s) substância(s) bioativa(s) de *Aspidosperma subincanum*, visando suas aplicações terapêuticas.

**Palavras-chaves:** *Aspidosperma subincanum*, atividade antibacteriana, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

**Apoio Financeiro:** FAPEMIG e Fundação Ezequiel Dias



## **RESUMOS**

**Número: 229**

### **EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES SUB-LETAIS DE SANITIZANTES SOBRE A SUSCETIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS EM *SALMONELLA* ISOLADAS DE ALIMENTOS**

**CRUZ, L.F.<sup>1</sup>; MAGALHÃES, J.T. <sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal de São João del-Rei, Campos Dona Lindu, Laboratório de Microbiologia. Divinópolis, Minas Gerais, Brasil. E-mail: [luisa\\_ferreira003@yahoo.com.br](mailto:luisa_ferreira003@yahoo.com.br)

Preocupações sobre as consequências decorrentes do uso excessivo de sanitizantes e a facilidade com que as bactérias tornam-se resistentes aos antibióticos vêm sendo discutido atualmente. A ocorrência de linhagens resistentes a sanitizantes pode representar desafios econômicos para a indústria de alimentos e trazer implicações para a saúde pública, já que a pressão seletiva exercida pela utilização inadequada desses sanitizantes pode levar a uma seleção de resistência aos antibióticos através de resistência cruzada, selecionando assim, clones que são resistentes tanto aos sanitizantes quanto a antibióticos. Onze isolados de *Salmonella* pertencentes aos sorotipos, Paratyphi, Typhi, Typhimurium e outros sorotipos causadores de infecção intestinal provenientes de alimentos foram expostos a concentrações sub-letais crescentes de Hipoclorito de Sódio. As culturas foram testadas, contra 12 antibióticos de importância clínica por meio da técnica de difusão em disco, antes e após a exposição do sanitizante. As culturas expostas ao agente mostraram susceptibilidade reduzida aos antibióticos, em comparação com as culturas não expostas. O impacto da exposição ao sanitizante na susceptibilidade reduzida aos antibióticos foi dependente do sorotipo de *Salmonella* e da família de antibióticos testada, sendo o perfil de mudança dos isolados diferente para as classes de antibióticos, exceto para cefalosporinas e quinolonas, em que todos os isolados que mudaram o perfil em cefepime mudaram também em ceftazidima, ocorrendo o mesmo para ciprofloxacino e levofloxacino. Além disso, aproximadamente 50% dos isolados mudaram seu perfil de sensibilidade para resistente para o cloranfenicol e o mesmo ocorreu com 42% dos isolados para o aztreonam. Os resultados no presente estudo sugerem que o uso excessivo de agentes sanitizantes em concentrações sub-letais poderia contribuir para o surgimento de resistência a antibióticos em *Salmonella* e, portanto, representam um risco para a saúde pública.

**Palavras chaves:** *Salmonella*, Sanitizantes, Antibióticos.

**Apoio Financeiro:**FAPEMIG, CNPq, UFSJ



## RESUMOS

Número: 230

### PROSPECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS VEGETAIS OBTIDOS DE *Maytenus* sp E *Tontelea* sp (Celastraceae) CONTRA *Staphylococcus aureus*

Cruz, W. S.<sup>1,2</sup>, Lima, W.G.<sup>1</sup>; Ferraz, A.C<sup>2</sup>; Palumbo, J. M. C.<sup>1</sup>; Morais, F. B.<sup>1</sup>; Ferreira, J.M.S.<sup>1</sup>; Soares, A.C.<sup>3</sup>; Magalhães, J.C.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia Médica, UFSJ, Divinópolis, MG. <sup>2</sup>Laboratório de Biologia Molecular e Celular, Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos (DQBIO), UFSJ, Ouro Branco, MG.

<sup>3</sup>Laboratório de Farmacologia da dor e Inflamação, UFSJ, Divinópolis, MG, Brasil. Email: [waleskaob@gmail.com](mailto:waleskaob@gmail.com).

*Staphylococcus aureus* é um coco Gram-positivo que compõe a microbiota natural humana, porém pode se tornar patogênico, causando desde leves infecções, como furúnculos e acnes, até infecções mais graves, como pneumonia e meningite. Esta bactéria, quando adquire resistência ao antibiótico betalactâmico meticilina, é chamada de MRSA (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*). No Brasil, cerca de 17% das infecções são causadas por *S. aureus*, sendo 70% delas causadas por MRSA, fato que torna importante a investigação de novos fármacos de ação contra esta bactéria. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de extratos naturais derivados de *Maytenus* sp e *Tontelea* sp (Celastraceae) contra *S. aureus*. Os extratos foram obtidos das folhas, galhos e raízes utilizando os solventes acetato de etila, hexano, metanol e clorofórmio. A atividade antibacteriana dos extratos frente a *S. aureus* ATCC 23103 foi determinada por meio da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição em caldo. Para os extratos que apresentaram atividade, foi determinada a atividade bactericida mínima (CBM). Amoxicilina e DMSO foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente. Dentro os onze extratos testados, dois apresentaram atividade antimicrobiana: o extrato hexânico obtido das raízes de *Tontelea* sp (ERHTM) e o extrato metanólico das raízes de *Maytenus* sp (ERDMTM). ERDMTM apresentou CIM de 31,25 µg/mL e, para ERHTM a CIM foi de 250 µg/mL. Amoxicilina foi ativa contra *S. aureus* na concentração de 1 µg/mL. Apesar de ter inibido o crescimento de *S. aureus* em uma concentração menor, ERDMTM não apresentou atividade bactericida, ao passo que ERHTM apresentou atividade bactericida na concentração de 250 µg/mL. Os resultados mostraram que, mesmo estas plantas tendo histórico de uso na medicina tradicional e alguns dos extratos apresentarem atividade antibacteriana, a grande maioria deles não foi capaz de inibir o crescimento de *S. aureus*.

**Palavras-Chave:** Atividade antibacteriana, *Staphylococcus aureus*, concentração inibitória mínima, concentração bactericida mínima, *Maytenus* sp, *Tontelea* sp.

**Apoio financeiro:** Capes, FAPEMIG, CNPq e UFSJ



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 231**

### **OBTENÇÃO DE LINHAGENS DE *Corynebacterium pseudotuberculosis* DEFICIENTES PARA PROTEÍNAS ASSOCIADAS COM O METABOLISMO DE GALACTOSE E FORMAÇÃO DE BIOFILME**

Luz, B.S.R.<sup>1</sup>; Oliveira Junior, A. F<sup>1</sup>; Gomes, L.G.R.<sup>1</sup>; Seyffert, N.<sup>1</sup>; Castro, T.L.P<sup>1</sup>; Azevedo, V.<sup>1</sup>;

<sup>1</sup>Laboratório de Genética Celular e Molecular, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. E-mail: [brenndally@hotmail.com](mailto:brenndally@hotmail.com)

*Corynebacterium pseudotuberculosis* é uma bactéria causadora da Linfadenite Caseosa, enfermidade que acomete ruminantes, causando perdas significativas nos rebanhos. O combate à doença é realizado pela remoção dos animais afetados, sendo o tratamento com antibióticos caro e ineficiente. Assim, a caracterização de determinantes de virulência de *C. pseudotuberculosis* é essencial para entender as bases moleculares da patogenicidade e elaborar estratégias para controlar a doença. Recentemente, análises filogenômicas apontaram que a enzima GALT (Galactose-1-P uridylyltransferase) está presente em todas as bactérias patogênicas do gênero *Corynebacterium*. Esta enzima está associada com a produção de UDP-galactose, que posteriormente é convertida em UDP-glicose, podendo ser parte de uma via metabólica alternativa de obtenção de energia durante a infecção, e associada à formação de biofilme composto por UDP-galactose e UDP-glicose. Adjacente ao gene GALT, foi identificada em *C. pseudotuberculosis* a sequência codificadora de uma provável proteína do envelope celular contendo o domínio LPXTG, relacionado à adesão celular e sobrevivência de bactérias patogênicas no hospedeiro. Para estudar o papel de GALT e da provável proteína de envelope celular nas infecções causadas por *C. pseudotuberculosis*, temos como objetivo a obtenção de linhagens mutantes por recombinação homóloga dupla. As sequências de DNA a montante e a jusante dos dois genes foram amplificadas por PCR e clonadas no vetor pK18mobsacB através da metodologia Gibson Assembly. O primeiro evento de recombinação na linhagem 1002 de *C. pseudotuberculosis* foi triado através da semeadura de transformantes em meio BHI contendo canamicina, enquanto que a seleção do segundo evento se dará pela semeadura das bactérias em BHI contendo sacarose a 10%. As linhagens mutantes serão utilizadas em ensaios de infecção e formação de biofilme para estudar o papel dessas proteínas no estabelecimento de *C. pseudotuberculosis* no hospedeiro.

**Palavras-chave:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*, GALT, LPXTG, virulência e patogenicidade, mutação gênica, clonagem molecular

**Apoio Financeiro:** CAPES, CNPq, FAPEMIG



## **RESUMOS**

**Número: 232**

### **IDENTIFICAÇÃO DE PLASMÍDIOS COLICINOGÊNICOS DE *Shigella sonnei***

Moreira, J. S.<sup>1</sup>; Clementino, D. M.<sup>1</sup>; Dias, M. G. M. A.<sup>1</sup>; Batista, T. M. <sup>2</sup>; Brito, G. A. M.<sup>2</sup>; Guimarães, N. R.<sup>1</sup>; Magalhães P.P.<sup>1</sup>; Farias L. M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG; <sup>2</sup>Laboratório de Genética e Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: jaquelinesmoreira@yahoo.com.br.

Colicinas são substâncias antagonistas com ação bactericida ou bacteriostática, principalmente contra bactérias filogeneticamente próximas. Os genes que as codificam estão localizados em plasmídios ou no cromossomo bacteriano. Plasmídios colicinogênicos foram isolados mais frequentemente de *Escherichia coli*, embora já tenham sido relatados para outras bactérias. O enteropatógeno *Shigella*, agente etiológico da shigelose, é responsável por quadros graves de diarreia, principalmente entre crianças de países menos desenvolvidos. Considerando a relevância das substâncias antagonistas, em especial, colicinas, o objetivo deste estudo foi verificar a presença de plasmídios colicinogênicos em amostra de *Shigella sonnei* isolada de espécime fecal de criança com doença diarréica aguda. O DNA plasmidial da amostra produtora de substância antagonista foi obtido pelo uso de *kit* comercial e a transferência plasmidial foi realizada por eletroporação, empregando *E. coli* BL21 (DE3). Os ensaios antagonista e eletroforético demonstraram a transferência de plasmídios codificadores de substâncias antagonistas. O sequenciamento plasmidial foi obtido por biblioteca paired-end e as reads geradas foram analisadas pelo sequenciador Illumina MiSeq. A qualidade das reads foi determinada pelo software FASTQC e a montagem dos plasmídios por algoritmo Spades 3.10.1. As sequências obtidas foram analisadas por similaridade em banco de dados Blastx. A análise do sequenciamento identificou a presença de três plasmídios selvagens de 46188, 6134 e 5320 pb, sendo, os dois últimos, codificadores de duas colicinas. A produção de colicinas já foi relatada para membros do gênero *Shigella*. A síntese dessas substâncias pode contribuir, indiretamente, para a patogenicidade da bactéria, uma vez que tais compostos podem atuar contra outros enteropatógenos e membros da microbiota indígena, facilitando a colonização pelo organismo.

**Palavras Chave:** Colicinas, substâncias antagonistas, *Shigella sonnei*, enteropatógenos.

**Apoio Financeiro:** FAPEMIG, CAPES, CNPq e PRPq/UFMG



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 233**

### **AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA DE SUPERFÍCIES INERTES DE DIFERENTES AMBIENTES EM UM ESTABELECIMENTO DE ASSISTÊNCIA EM SAÚDE**

Pessoa. M. S<sup>1</sup>; Lima. A. L<sup>1</sup>; Pereira. F. O<sup>1</sup>; Silva. T. O<sup>1</sup>; Oliva. M. L. V<sup>2</sup>; Brito. M. V<sup>1</sup>; Carvalho. M. T. M<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Curso de Biomedicina – Universidade do Estado de Minas Gerais – UEMG – Unidade de Passos. <sup>2</sup> Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – Campus São Paulo. E-mail: [matheusantanap@gmail.com](mailto:matheusantanap@gmail.com)

Atualmente tem sido relatado um frequente aumento nos casos de infecções hospitalares causadas por microrganismos patogênicos. Esses patógenos muitas vezes são encontrados em superfícies inertes como equipamentos e matérias hospitalares. Alguns dos microrganismos comumente encontrados nessas superfícies são o *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE) e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), que são responsáveis pelo grande número de casos de morbimortalidade. Objetivou-se com o presente estudo a realização de uma análise bacteriológica de superfícies inertes em um determinado estabelecimento de assistência em saúde, com o intuito de gerar conhecimentos sobre uma correta higienização auxiliando no controle de infecções. É uma pesquisa quantitativa e qualitativa descritiva, onde foi realizada uma coleta sem aviso prévio e outra com aviso prévio, sendo selecionados 5 diferentes setores do estabelecimento e em cada um, 5 superfícies inertes para análise bacteriológica em cada momento, totalizando 50 amostras. As amostras foram coletadas utilizando o meio de transporte Stuart para posterior semeadura em ágar sangue e isolamento das colônias. Após o isolamento, algumas colônias, selecionadas aleatoriamente, foram submetidas a uma coloração de Gram para direcionar a identificação para as provas bioquímicas específicas para bactérias Gram negativas ou Gram positivas. Foram isoladas 75 colônias de bactérias em 41 placas com crescimento positivo, sendo 24 placas antes da assepsia e 17 após a assepsia. Vários desses microrganismos identificados estavam presentes na UTI e no bloco cirúrgico, os quais se destacam *Staphylococcus coagulase negativa* e *Bacillus* sp., porém, observou-se também a presença de bactérias Gram negativas como a *Providencia* sp. e *Enterobacter* sp. É necessário um monitoramento contínuo desses locais e dos equipamentos a fim de realizar um controle rigoroso da assepsia evitando assim, o aumento do número de casos de infecções.

**Palavras chaves:** microrganismos, infecções hospitalares, septicemia.

**Apoio Financeiro:** PAPq



## **RESUMOS**

**Número: 234**

### **AVALIAÇÃO DO EFEITO DE UMA LINHAGEM DE *Lactobacillus reuteri* ISOLADA DO ESTÔMAGO DE SUÍNOS EM ENSAIOS *in vitro* E *in vivo* CONTRA INFECÇÃO POR *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar *Typhimurium***

*Melina A. Cordeiro, Katharina O. Barros, Indianara Machado, Breno F. Barbosa, Jacques R. Nicoli, Sílvia B. Moura, Flaviano S. Martins\**

Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.  
\*flaviano@icb.ufmg.br

A suinocultura é uma atividade de importância econômica e social para o Brasil. O uso persistente de antibióticos como promotores de crescimento na alimentação animal é um fator que contribui com o aumento de bactérias resistentes, o desequilíbrio da microbiota intestinal normal, além de deixar resíduos em produtos animais. Dentre as alternativas ao uso de promotores de crescimento, os probióticos vêm ganhando destaque. Probióticos são micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades suficientes, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Muitos desses micro-organismos são administrados em alimentos, com o intuito de ajudar a prevenir ou tratar doenças, especialmente do trato gastrointestinal. Este trabalho teve como objetivo testar *in vivo* uma linhagem de *Lactobacillus reuteri* (L41) que apresentou potencial probiótico *in vitro* contra a bactéria *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar *Typhimurium* (ST). Foi realizado o teste de mortalidade em camundongos infectados com ST utilizando a linhagem L41. Os animais foram tratados (diariamente durante todo o experimento) a partir do dia zero com uma dose de  $10^8$  UFC de L41 (grupo teste) ou PBS no grupo controle (sem tratamento). No dia 10, os animais dos dois grupos foram desafiados com uma dose de  $10^5$  UFC de ST e acompanhados até o dia 38, avaliando-se desenvolvimento ponderal e sobrevivência. Ao final do experimento, a linhagem L41 foi capaz de proteger os animais contra a infecção, sendo observada a sobrevivência de 100% dos animais no grupo teste (L41+ST) enquanto, no grupo controle (PBS+ST) nenhum dos animais sobreviveu à infecção pelo patógeno. Os resultados demonstram que a linhagem de *L. reuteri* L41 tem potencial probiótico que merece ser investigado de forma mais aprofundada.

**Palavras-chave:** probiótico, *Lactobacillus reuteri*, suíno, *Salmonella Typhimurium*

**Financiamento:** CAPES, CNPq.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 235**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FARINHAS DE RESÍDUO DE MAÇÃ (*Malus domestica*) E SEU POTENCIAL DE USO COMO CONSERVANTE NATURAL PARA ALIMENTOS SECOS**

Duarte, N.B.A.<sup>1</sup>; Lima, D.S.<sup>2</sup>; Sande, D.S.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde do Centro Universitário de Belo Horizonte - UNIBH. Belo Horizonte, MG

A utilização de antimicrobianos naturais presentes nos ingredientes visa prolongar a vida útil dos alimentos e garantir a sua segurança alimentar. Para a conservação de alimentos secos diferentes especiarias e componentes de origem vegetal podem ser utilizados com este propósito. O objetivo deste trabalho consiste em comparar a atividade antimicrobiana da farinha obtida a partir do bagaço da maçã (*Malus domestica*) de duas espécies (fuji e verde) contra patógenos que causam doenças transmitidas por alimentos. A atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos das farinhas foi avaliada contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Gram negativo) e *Listeria monocytogenes* ATCC15313 (Gram positivo). Essas bactérias foram previamente cultivadas em caldo BHI, a 37 °C, por 24 h. O ensaio foi realizado em placa de 96 poços por diluição em série de extratos (250-1.95 µg / mL) e adicionando um inóculo padronizado (intervalo de McFarland de 0,5 Mc, ou seja, 10<sup>8</sup> células / mL) de bactérias cultivadas em caldo BHI. Em seguida, as placas foram incubadas a 37 °C. Após 24 h, foi feita uma leitura a 490 nm para verificar a percentagem de inibição do crescimento. Apesar da Maçã Fuji ter apresentado o maior potencial antimicrobiano contra as duas bactérias *Pseudomonas aeruginosa* (78,6± 3,12) e *Listeria monocytogenes* (49,9 ± 1,7), a maçã verde também promoveu a inibição das bactérias testadas (41,1 ± 4,3 e 26,1 ± 0,24, respectivamente). Estes resultados indicam o potencial de uso das farinha de resíduos de maçã fuji e verde em alimentos secos como conservante natural.

Palavras-chave: Biotecnologia, conservante natural, porcentagem de inibição, reaproveitamento.

**Apoio financeiro:** Centro Universitário de Belo Horizonte (UNI-BH)



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 236**

### **EFEITOS DE EXTRATOS DE *Eugenia dysenterica* DA REGIÃO DE DIVINÓPOLIS-MG SOBRE *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.**

Gonçalves, T.P.R.<sup>1</sup>; Parreira, A.G.<sup>2</sup>; Lima, W.G.<sup>3</sup>; Coimbra, M.C.<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Graduanda em Ciências Biológicas UEMG- Unidade Divinópolis-MG.<sup>2</sup>Docente UEMG- Unidade Divinópolis-MG. <sup>3</sup>Laboratório de Ciências Farmacêuticas- UFSJ-CCO, Divinópolis-MG. <sup>4</sup>Laboratório de Fitoquímica -UFSJ -CCO, Divinópolis-MG. E-mail: thaispaula.rgs@outlook.com

Nos últimos anos o investimento em plantas medicinais pela indústria farmacêutica atingiu cifras milionárias, embora seu uso na medicina popular já seja uma prática reconhecida há séculos. Neste contexto, torna-se de fundamental importância o estímulo ao desenvolvimento de estudos de prospecção de novos espécimes vegetais com potencial terapêutico, com destaque para aquelas que apresentam atividade antimicrobiana. *Staphylococcus aureus* é uma bactéria de grande importância em saúde pública mundial, especialmente para algumas cepas que já apresentam resistência a antimicrobianos tradicionais. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antimicrobiano de extratos de *Eugenia dysenterica* coletada na região de Divinópolis-MG frente a *S.aureus* ATCC 25923. Extratos hidroetanólicos foram obtidos a partir de secagem, Trituração e diluição na proporção 9:1 de álcool e vegetal respectivamente, posteriormente, os extratos foram liofilizados para obtenção de um fino pó e as amostras diluídas em água e DMSO. Para a avaliação do efeito antimicrobiano dos extratos vegetais frente a *S. aureus*, ATCC 25923, foram determinadas a CIM, CBM, e executado o teste qualitativo Disco-difusão em ágar. Foi determinado ainda o efeito sinérgico, simulando a interação do extrato com os antibióticos comerciais: cefalexina, amoxicilina e tetraciclina. Extratos de partes aéreas de *E.dysenterica* apresentaram ação bactericida a 2 mg. ml<sup>-1</sup> no teste CIM e CBM. Apresentou ainda halo de inibição caracterizado como sensível no teste qualitativo e efeito sinérgico combinado ao antibiótico comercial tetraciclina. Com este trabalho foi possível confirmar o grande potencial da espécie vegetal *E. dysenterica* frente a *S.aureus* ATCC 25923 baseados em 4 antibiogramas, sendo necessário ainda estudos complementares no sentido de determinar sua eventual citotoxicidade para células de mamíferos assim como determinação da fração que apresenta atividade antimicrobiana.

**Palavras chaves:** *Eugenia dysenterica*, Extratos, Antimicrobiano, *Staphylococcus aureus*.  
**Apoio Financeiro:** Fapemig.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 237**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROMOTORA DOS GENES CODIFICADORES DE FATORES SIGMA EM *Corynebacterium pseudotuberculosis* APÓS EXPOSIÇÃO AO ESTRESSE OXIDATIVO**

Luz, B.S.R.<sup>1</sup>; Seyffert, N.<sup>1</sup>; Gomes, L.G.R.<sup>1</sup>; Tiwari, S.; Azevedo, V.<sup>1</sup>; Castro, T.L.P<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Genética Celular e Molecular, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. E-mail: [brenndally@hotmail.com](mailto:brenndally@hotmail.com)

*Corynebacterium pseudotuberculosis* é uma bactéria Gram-positiva causadora da Linfadenite Caseosa, uma enfermidade que acomete ovinos e caprinos, causando grandes perdas econômicas no mundo. Intracelular facultativo, esse patógeno persiste por longos períodos de tempo tanto no hospedeiro quanto no ambiente externo, demonstrando sua capacidade de resistir a condições adversas. A ativação transiente dos fatores sigma ( $\sigma$ ) da RNA polimerase é um dos mecanismos que proporcionam rápida adaptação bacteriana a situações adversas, pois cada fator sigma reconhece sequências promotoras específicas no genoma e ativa a expressão coordenada de um conjunto de genes envolvidos na resposta necessária. Neste trabalho, foi utilizada a indução diferencial da proteína verde fluorescente (GFP) como estratégia para avaliar a ativação dos fatores sigma de *C. pseudotuberculosis* quando esta bactéria é exposta ao estresse oxidativo. Primeiramente, as regiões promotoras dos genes codificadores de fatores sigma foram clonadas a montante do gene *gfp* no plasmídeo *promoterless pSM20*. Foi utilizada a linhagem TOP10 de *Escherichia coli* para este propósito e todas as construções foram confirmadas através de digestão, PCR e sequenciamento do DNA. Posteriormente, os plasmídeos obtidos foram individualmente transferidos para a linhagem 1002 de *C. pseudotuberculosis*. As linhagens contendo os diferentes plasmídeos foram cultivadas até a fase de crescimento exponencial e então submetidas à quinona plumbagina para avaliação da produção de GFP. Após 30 minutos de estresse, o promotor de *sigB* (gene codificador do fator  $\sigma^B$ ) induziu uma menor produção de GFP em relação à condição normal de crescimento, revelando que este regulador é reprimido sob intensa atividade oxidativa. Como perspectiva, pretendemos investigar o papel do fator  $\sigma^B$  na regulação gênica bacteriana e na infecção do hospedeiro, além de verificar o perfil de ativação dos fatores  $\sigma^C$ ,  $\sigma^D$ ,  $\sigma^E$ ,  $\sigma^H$ ,  $\sigma^K$  e  $\sigma^M$  em outras situações de estresse ambiental.

**Palavras-chave:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*, fatores sigma bacterianos, estresse oxidativo, proteína verde fluorescente (GFP), clonagem molecular

**Apoio Financeiro:** CAPES, CNPq, FAPEMIG



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 238**

### **PAPEL DAS ECTONUCLEOTIDASES CD39 E CD73 NO MECANISMO DE PROTEÇÃO DO PROBIÓTICO *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 DURANTE A INFLAMAÇÃO ALÉRGICA PULMONAR EXPERIMENTAL**

**MONTUORI-ANDRADE, A.C.M<sup>1</sup>; NOLASCO, A.E.S<sup>1</sup>; AFONSO, L.C.C<sup>2</sup>; VIEIRA, L.Q<sup>1</sup>; DOS SANTOS, L.M<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brasil.

<sup>2</sup>Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

CD39 e CD73 são proteínas de membrana com atividade enzimática que desempenham um papel na regulação de sinais purinérgicos destinados a células imunes através da conversão de ADP/ATP a AMP e de AMP a adenosina (ADEN). Isso leva a mudança de um ambiente pró-inflamatório induzido por ATP a um ambiente anti-inflamatório induzido por ADEN. ADEN é um potente nucleosídeo sinalizador importante na regulação da homeostase no pulmão e tem sido relacionada a alergia pulmonar. Estudos recentes do nosso laboratório mostram que o probiótico *L. delbrueckii* UFV-H2b20 (LAC) possui efeitos protetores na inflamação alérgica pulmonar experimental (IAPE). Neste trabalho investigamos um possível envolvimento de CD39 e CD73 como mecanismo de ação pelo qual o LAC exerce seu efeito protetor durante a IAPE. Camundongos BALB/c receberam diariamente  $10^9$  LAC viáveis por via oral começando dez dias antes da sensibilização e assim continuaram até o dia da eutanásia. O grupo controle recebeu salina. A IAPE foi induzida pela exposição dos camundongos sensibilizados com ovalbumina (OVA) à nebulização com OVA por sete dias consecutivos. Os camundongos foram sacrificados no dia do último desafio. Os resultados *in vivo* mostraram que o tratamento com LAC diminui o infiltrado inflamatório no pulmão dos animais tratados diminuindo o número de monócitos inflamatórios, eosinófilos e MO alveolares. Os resultados mostraram ainda um aumento de células Treg, T CD4<sup>+</sup> e T CD8 nos pulmões destes animais e um aumento do número de células expressando as ectonucleotidases CD39 e CD73. O tratamento com LAC inibe a resposta inflamatória nas vias aéreas dos camundongos BALB/c e nossos resultados sugerem que seu mecanismo de ação está relacionado ao aumento do número de linfócitos expressando CD39 e CD73 que são moléculas indicadoras do aumento de adenosina no ambiente inflamatório.

**Palavras chave:** Ectonucleotidas CD39 e CD73, Inflamação alérgica pulmonar, probiótico, *Lactobacillus delbrueckii*

**Suporte financeiro:** CAPES, FAPEMIG e CNPq



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 239**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO DE FOLHAS DE *Dorstenia vitifolia* Gardner (Moraceae).**

Lopes, K.L.<sup>1</sup>; Rocha, M.P.<sup>1</sup>; Scoaris, D.O.<sup>2</sup>; Almeida, V.L.<sup>2</sup>; Silva, A.F.<sup>3</sup>; Silva, C.G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG. <sup>2</sup>Serviço de Fitoquímica e Prospecção Farmacêutica, FUNED, Belo Horizonte, MG. <sup>3</sup>Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. E-mail: [karolynalopes@funed.mg.gov.br](mailto:karolynalopes@funed.mg.gov.br)

O interesse em plantas do gênero *Dorstenia* vem aumentando durante a última década, com artigos publicados sobre mais de 25 espécies. Muitas delas são utilizadas na medicina tradicional como anti-infecciosas, antirreumáticas, antitussígenas, contra bronquite, doenças de pele, feridas infectadas e picadas de cobra. No Brasil são encontradas 37 espécies distribuídas em regiões da Mata Atlântica, Mata de Galeria, Mata Ciliar e Cerrado. A análise fitoquímica aliada à avaliação da atividade biológica contribui para o estudo da biodiversidade. Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de frações do extrato EtOH de folhas de *Dorstenia vitifolia* frente às bactérias *Escherichia coli* (ATCC 11775) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), pelo método de microdiluição em caldo, segundo NCCLS M7-A6 (2003), com adaptações. Foi realizada a partição do extrato etanólico das folhas, com solventes de polaridades crescentes, obtendo-se 6 frações, com os respectivos rendimentos: em n-hexano (13,82%), metanólica (8,58%), em diclorometano (0,39%), em acetato de etila (0,99%), em n-butanol (3,93%) e hidroalcoólica (31,39%). As frações (1 mg/mL) foram avaliadas, em triplicata, para a atividade antimicrobiana. Cloranfenicol foi empregado como controle positivo (100 µg/mL), apresentando 100% de inibição para os 2 microrganismos avaliados. A fração obtida em diclorometano apresentou melhor resultado quanto à inibição de *E. coli* ( $49,25 \pm 19,72\%$ ). Em relação à inibição de *S. aureus*, as frações em n-hexano ( $66,59 \pm 8,90\%$ ) e n-butanol ( $63,46 \pm 8,12\%$ ) foram consideradas promissoras, por apresentarem valores do percentual de inibição superior a 60%. Futuramente, estas frações serão submetidas ao estudo fitoquímico biomonitorado pela atividade antimicrobiana frente à *S. aureus* visando obter substâncias bioativas. Considerando a literatura consultada, este é o primeiro trabalho que relata a atividade antimicrobiana de frações do extrato de folhas de *D. vitifolia*.

**Palavras chave:** *Dorstenia vitifolia*, atividade antimicrobiana, fracionamento fitoquímico, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

**Apoio financeiro:** FAPEMIG, FUNED.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 240**

**AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DE BISCOITOS ELABORADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FARINHAS DE CASCA DE ABACAXI E TANGERINA**

Matias M.G.S.<sup>1</sup>, Souza J.P.M.<sup>2</sup>, de Miranda, G.M.D.<sup>2</sup>, Alvarenga K. L. F.<sup>2</sup>, Moreira A.C.S.<sup>2</sup>, Papa B.A.J<sup>2</sup>, Araújo, R.L.B<sup>1</sup>; Fabrini, S.P<sup>2</sup>; Oliveira, R.B.P<sup>1</sup>; Sande<sup>1,2</sup>, D.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Minas Gerais – Minas Gerais. <sup>2</sup>Centro Universitário de Belo Horizonte (UNIBH) – Minas Gerais.

Laboratório de Microbiologia Industrial e Biocatálise, Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte, MG. E-mail: [maira.gsmatias@gmail.com](mailto:maira.gsmatias@gmail.com)

A fruticultura é um importante setor do agronegócio brasileiro, colocando o país como o terceiro maior produtor de frutas do mundo. Combater o desperdício de alimentos está entre os principais desafios para que o setor continue se expandindo. Neste contexto, o aproveitamento das cascas das frutas para o desenvolvimento de produtos apresenta-se como uma alternativa a ser estudada. O objetivo deste trabalho foi avaliar os parâmetros físico-químicos das farinhas de casca de abacaxi e tangerina e realizar a análise de *Salmonella* dos biscoitos elaborados a partir da mistura das farinhas nas proporções de 10 e 30%. Para a obtenção das farinhas, as cascas das frutas foram trituradas e secas. A umidade foi determinadas através da secagem em estufa comum a 105 °C, o extrato etéreo (gordura bruta) através da extração com éter a quente – Método de Soxhlet, o resíduo mineral fixo por incineração em mufla a 550 °C e as proteínas pelo método de Kjeldahl. Foi realizada a pesquisa de *Samonella sp.* utilizando 25 g dos biscoitos 100% farinha de trigo (controle), 10 e 30% da mistura das farinhas de abacaxi e tangerina. As farinhas de abacaxi e tangerina apresentaram 10,2% e 13,1% de umidade, 0,708 e 0,815% de gordura bruta, 5,3% e 3,7% de resíduo mineral, 1,44% e 1,56% de proteínas, respectivamente. A pesquisa de *Salmonella* mostrou a ausência da bactéria nas três formulações apresentadas, atendendo o estabelecido pela ANVISA (RDC 12 de 2001). Conclui-se que o correto preparo e higienização dos alimentos são capazes de garantir a segurança microbiológica dos biscoitos. Portanto o desenvolvimento de produtos utilizando cascas de frutas é uma alternativa viável e segura para aumentar o aproveitamento dos valores nutricionais das frutas e reduzir o desperdício.

**Palavras Chave:** Farinhas de cascas de frutas, composição centesimal, *Salmonella*, reaproveitamento.



## RESUMOS

Número: 241

### AVALIAÇÃO DOS EFEITOS PROTETORES DO TRATAMENTO COM SOBRENADANTE DA CULTURA DE *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2B20 NA INFLAMAÇÃO ALÉRGICA PULMONAR PARA INVESTIGAR MECANISMO DE AÇÃO DO PROBIÓTICO

**ANA ELISA NOLASCO E SILVA;** ANA CLARA M. MONTUORI DE ANDRADE; LEDA QUERCIA VIEIRA; LILIANE MARTINS DOS SANTOS.

Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brasil.

Estudos com espécies probióticas tem mostrado sua capacidade imunomoduladora em modelos experimentais. Análises da atuação sistêmica de produtos solúveis produzidos pela microbiota intestinal mostram que estes produtos podem alterar a concentração de mediadores imunológicos e a capacidade de produtos bacterianos serem protetivos contra a alergia pulmonar. Estudos do nosso laboratório mostram que o *L. delbrueckii* UFV-H2b20(LAC) possui efeitos protetores na alergia pulmonar experimental(APE) em camundongos. Neste trabalho investigamos a possibilidade de um metabólito produzido pelo LAC atuar como mediador da resposta protetiva durante a APE. Camundongos BALB/c receberam diariamente  $10^9$  LAC viáveis,  $10^9$  LAC mortos por calor ou sobrenadante da cultura (SOB) por via oral, durante todo o experimento. Os grupos controles receberam salina pura ou meio MRS. A APE foi induzida pela exposição dos camundongos sensibilizados com ovalbumina (OVA) e nebulização com OVA por sete dias consecutivos, a eutanásia foi realizada após o último desafio. O tratamento com LAC VIVO e SOB tem capacidade de modular a produção citocinas, além de reduzir monócitos inflamatórios, eosinófilos e macrófagos alveolares nos pulmões dos animais tratados. Os tratamentos mostraram potencial de inibir a resposta inflamatória nas vias aéreas dos camundongos BALB/c, sugerindo que sua ação está relacionada à atividade desencadeada por um metabólito que, por imunomodulação, aumenta a tolerância periférica.

**Palavras chave:** *Lactobacillus delbrueckii*, Alergia pulmonar, metabólitos

**Suporte financeiro:** CAPES, FAPEMIG, CNPq



## **RESUMOS**

**Número: 242**

### **CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE FLORES DE HIBISCO (*Hibiscus sabdariff*) CONTRA CEPAS DE *Escherichia coli* E *Staphylococcus aureus***

Quidigno CA<sup>1</sup>, Baldivia BC<sup>2</sup>, Andrade MC<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica do 4º ano da Faculdade de Medicina de Itajubá, Itajubá, MG, <sup>2</sup>Acadêmica do 4º ano da Faculdade de Medicina de Itajubá, Itajubá, MG, <sup>3</sup>Departamento de Fisiopatologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual de Montes Claros. Email: camila.alcantaraq@gmail.com

O extrato alcoólico do cálice do hibisco possui maior quantidade de antocianinas, o que confere ao cálice maior poder antimicrobiano. Isso confirma a importância dos produtos naturais como alternativa para o descobrimento de novos fármacos e mostra uma forma mais econômica e viável no controle de doenças. O objetivo deste estudo foi verificar o efeito antimicrobiano de flores de *Hibiscus sabdariff* contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Utilizou-se 20 cepas de *E.coli* e 20 de *S.aureus*. Colocou-se 50µl de caldo *Müller Hunton* em todos os poços. Adicionou-se 10µl de cada cepa bacteriana na concentração de  $1 \times 10^8$  UFC/mL, previamente estabelecido utilizando a escala 0,5 de McFarland. Colocou-se 50µl do extrato de *Hibiscus sabdariff* em diferentes concentrações nas linhas horizontais (1 a 10 da placa): a fileira A recebeu a concentração de 250 mg/mL, diminuindo a concentração na metade até a fileira H. A coluna 11 de cada placa recebeu o controle positivo, com 100 µL de caldo *Müller Hunton* e 10 µl de uma cepa bacteriana controle, e a coluna 12, o controle negativo. As placas foram incubadas em estufa 35°C por 24h. Depois, adicionou-se 20µl de Trifenil Terezólico 0,2% em todos os poços seguindo-se a incubação. Depois de 3h, realizou-se a leitura das placas através da coloração obtida. Nas concentrações 200 mg/ml, 100 mg/ml, 50 mg/ml e 25 mg/ml do extrato de hibisco, 100% das cepas de *E.coli* e *S.aureus* foram inibidas. Em 12,5 mg/ml, 10% das cepas de *E.coli* não foram inibidas e 100% das cepas de *S. aureus* foram inibidas. Em 6,25 mg/ml, 5% das cepas de *E.coli* não foram inibidas e 20% das cepas de *S. aureus* foram inibidas. Em 3,125 mg/ml, 50% das cepas de *E.coli* e 85% das cepas de *S. aureus* não foram inibidas. Na concentração de 1,5625 mg/ml, 80% das cepas de *E.coli* e 85% das cepas de *S.aureus* não foram inibidas. Concluindo, encontrou-se uma satisfatória atividade antimicrobiana das flores de Hibisco contra cepas *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

**Palavras-chave:** *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Hibiscus sabdariff*, Atividade antibacteriana

**Apoio Financeiro:** FAPEMIG



## **RESUMOS**

**Número: 243**

### **ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA DE BEBEDOUROS DE UMA UNIDADE DE ENSINO HOSPITALAR NO SUL DE MINAS GERAIS**

Silva, E.M.A.S.<sup>1</sup>; Andrade, M.C<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Acadêmica do terceiro ano do curso de Medicina da Faculdade de Medicina de Itajubá-MG. <sup>2</sup>Professora titular das disciplinas de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia Básica na Faculdade de Medicina de Itajubá-MG. E-mail: [elisasilvaemas@hotmail.com](mailto:elisasilvaemas@hotmail.com)

**Introdução:** Embora seja um elemento essencial, a água também pode trazer riscos à saúde, servindo de veículo para vários agentes biológicos e químicos. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) revelam que 80% das doenças nos países em desenvolvimento são causadas pela água contaminada. As bactérias do grupo coliformes são empregadas como indicadores biológicos específicos na análise ou monitoramento de qualidade de água. A análise bacteriológica da água é uma importante ferramenta para a determinação da qualidade da água de consumo. O movimento pela qualidade têm se expandido para o setor da saúde e o controle de infecção hospitalar é uma das medidas para avaliação, pois tal controle permite que a instituição de saúde avalie o serviço prestado. **Metodologia:** Informações prévias demonstraram a presença de 32 bebedouros nas dependências do Hospital Escola da Faculdade de Medicina de Itajubá (HE-FMIt). Foram coletadas 3 (três) amostras de 100 mililitros de água de 23 desses bebedouros. Posteriormente foram transferidas ao Laboratório de Microbiologia da FMIt onde se aplicou as técnicas de Pour Plate e tubos múltiplos, ou número mais provável (NMP). Nos tubos presuntivamente positivos, seria realizada a confirmação com Caldo Verde Brilhante Bile 2 % (VBB). Os tubos com VBB positivos seriam replicados para tubos com caldo E. coli suplementado com 4 metil umbeliferil β-D glucoronideo (EC-MUG), utilizado para determinar de forma simultânea, a presença de coliformes fecais e E. coli. **Resultados:** Em nenhuma das amostras já coletadas houve resultado positivo na técnica de tubos múltiplos, desta forma não foi necessário prosseguir com a análise em Caldo Verde Brilhante Bile 2% e caldo E. coli suplementado. O teste de Pour Plate também não apresentou resultados positivos em nenhuma das amostras coletadas. **Conclusões:** A partir dos resultados parciais é possível concluir que a água dos bebedouros já analisados está livre de contaminação por coliformes fecais e E. coli.

**Palavras-chave:** Análise Microbiológica; Água Doce; Coliformes.

**Apoio Financeiro:** FAPEMIG.



## **RESUMOS**

**Número: 244**

### **INFLUÊNCIA DAS VARIAÇÕES GENOTÍPICAS DE *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans* NA EXPRESSÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA**

Freitas, G.J.C.<sup>1</sup>; Costa, M.C.<sup>1</sup>; Carneiro, H.C<sup>1</sup>; Santos, D.A.<sup>1</sup>;

<sup>1</sup>Laboratório de Micologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. gujcf@yahoo.com.br

A criptococose é uma micose invasiva com incidência de um milhão de casos anualmente, e desses, 65% estão relacionados a óbito. Sua etiologia está principalmente relacionada às espécies de *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans*. Classicamente, as espécies de *C. neoformans* são divididas em quatro genótipos (VNI a VNIV) e as de *C. gattii* em cinco genótipos (VGII a VGIV). No entanto, recentemente foi proposta uma nova classificação para essas espécies, em que *C. neoformans* seria dividido em duas espécies e *C. gattii* em cinco novas espécies, baseada na diversidade fiolegenética encontrada dentro de *C. gattii* e *C. neoformans*. Assim, esse trabalho tem como objetivo avaliar influência da diversidade genética de *C. gattii* e *C. neoformans* na expressão de fatores de virulência. Para isso, foram utilizadas cinco linhagens de *C. gattii* e cinco de *C. neoformans* com o tipo molecular previamente conhecido. As linhagens foram avaliadas quanto a produção de melanina, termotolerância e produção de cápsula. A linhagem de *C. gattii*/VGII apresentou maior espessura capsular em relação a *C. gattii*/VGII, VGIII e VGIV. Para *C. neoformans*, as variações foram mais marcantes, as linhagens VNII e VNIII apresentaram espessura capsular reduzida quando comparadas aos genótipos VNI e VNIV. A produção de melanina foi maior para os genótipos VGII, VGIV, VNI e VNIV em relação as outras linhagens, onde a produção do pigmento foi ausente ou substancial. A termotolerância foi mais elevada para *C. gattii* VGII, VGIII e *C. neoformans*/VNIII, VNIV, enquanto as outras linhagens apresentaram redução do crescimento em função da temperatura. As linhagens ainda serão analisadas em modelo murino e em macrófagos para melhor avaliação da virulência. Nossos resultados sugerem que a expressão de fatores de virulência em *C. gattii* e *C. neoformans* pode variar de acordo com o tipo molecular envolvido, influenciando na sobrevivência, na capacidade infecciosa desse micro-organismo e nas suas variações epidemiológicas.

**Palavras-chave:** Criptococose, virulência, diversidade filogenética.

**Apoio financeiro:** CNPq e UFMG-PRPq.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 245**

**GENDER INFLUENCE ON CRYPTOCOCCOSIS**

<sup>1</sup>COSTA, M.C.; <sup>2</sup>FERNANDES, H. B.; <sup>3</sup>GONÇALVES, G. K. N.; <sup>1</sup>SANTOS, A. P. N.; <sup>1</sup>FREITAS, G. J. C.;  
<sup>4</sup>SANTOS, J. L.; <sup>3</sup>REIS, A. M.; <sup>5</sup>FAGUNDES, C. T.; <sup>2</sup>SILVA, A. M.; <sup>1</sup>SANTOS, D. A.

1.Laboratório de Micologia, ICB-UFMG; 2. Laboratório de Genes Inflamatórios, ICB-UFMG; 3.Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo, ICB-UFMG; 4. Laboratório de Imunologia, DCB-UESC; 5. Laboratório de Interação Microrganismo-Hospedeiro, ICB-UFMG.

*Cryptococcus gattii* is one of the agents of cryptococcosis, a systemic mycosis that occurs in human and animals worldwide. Experimental and clinical studies demonstrated that the disease is more frequent in males, and females develop less severe clinical conditions. Thereby, this study aimed to evaluate gender and β-estradiol influence at host response to cryptococcosis. Female mice had increased survival and reduced fungal burden during the infection with *C. gattii* in comparison to male mice. The gonadectomy reverted this phenotype and the hormone replacement increased the survival of female mice. The analysis of cell recruitment in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) demonstrates the increased levels of neutrophil in the female mice, but no differences in the recognizing receptors in neutrophil and macrophages in the BALF. Otherwise, considering the important role of macrophages during cryptococcosis, we further verified that β-estradiol induces changes in fungal morphology that lead to best phagocytic and fungicide activity by female bone-marrow derived macrophages, which demonstrated higher production of reactive oxygen species, which was increased by β-estradiol. The inhibition of β-estradiol receptors ERα and GPER, but not ERβ, hampered the phagocytosis and killing activity of the macrophages. Further, we noted that β-estradiol reduced the expression of pAKT and pERK and the inhibition of ERα and GPER reverted the effects this hormone. Taken together, these findings explain in part how female cells can control the infection better than male mice leading to higher survival in this gender. Questions remain, however, our results are the first to demonstrate these important differences and the cellular mechanisms involved in these responses.

**Key-words:** *C. gattii*, gender, β-estradiol, host-fungus interaction

**Funding:** CNPq, CAPES, FAPEMIG



## **RESUMOS**

**Número: 246**

### **COMPOSTO INÉDITO DERIVADO DE ALCALOIDE MARINHO INIBE UM IMPORTANTE FATOR DE VIRULÊNCIA - HIFAS, EM *Candida albicans***

**Morais, F. B.<sup>1</sup>; Andrade, J. T.<sup>1</sup>; Silva, M. K. P.<sup>1</sup>; Palumbo, J. M. C.<sup>1</sup>; Lima, W. G.<sup>1</sup>; Nascimento, L. A. A.<sup>1</sup>; Cruz, W. S.<sup>1</sup>; Sousa, J. F.<sup>2</sup>; Viana, G. H. R.<sup>2</sup>; Ferreira, J. M. S.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia Médica, CCO/UFSJ, Divinópolis, MG. <sup>2</sup>Laboratório de Síntese Orgânica, CCO/UFSJ, Divinópolis, MG. E-mail: [fernandamoraisfbm@gmail.com](mailto:fernandamoraisfbm@gmail.com)

*Candida albicans* é normalmente um microorganismo comensal nos seres humanos, entretanto, pode se tornar patogênico. A sua virulência tem sido associada a sua capacidade de transição entre levedura-hifa. Apesar da existência de agentes antifúngicos, tem sido descrito um aumento da resistência de *C. albicans*. Nesse contexto, faz-se necessário a busca de novos protótipos antifúngicos. Este estudo foi elaborado com o objetivo de avaliar o efeito de um alcaloide marinho sintético inédito (1) na inibição da formação de hifas de *C. albicans* ATCC 18804. O ensaio foi desenvolvido por meio da técnica de microdiluição em caldo, utilizando Soro Fetal Bovino puro como meio de cultura. Como controle antifúngico, foi utilizado cetoconazol (125 $\mu$ g/mL) e como controle do solvente, dimetilsulfóxido (DMSO) 2%. De acordo com a Concentração Inibitória Mínima (CIM) feita previamente, o alcaloide marinho sintético (1) foi testado na concentração de 10 $\mu$ g/mL (CIM) e 20 $\mu$ g/ml (2x CIM). As microplacas foram incubadas a 37°C por 24, 48 e 72 horas e nesses intervalos de tempo, lâminas a fresco contendo alíquotas de 20 $\mu$ L foram preparadas e observadas ao microscópio de luz no aumento de 400X. As lâminas contendo o controle de crescimento, o controle de esterilidade, DMSO e cetoconazol também foram analisados. Os experimentos foram feitos em triplicata e repetidos três vezes. Os resultados mostraram que o composto (1) diminuiu a formação das hifas na concentração de 10  $\mu$ g/mL em relação ao controle de crescimento e inibiu totalmente a formação das hifas na concentração de 20  $\mu$ g/mL. Este efeito pode ser observado nas primeiras 24 horas de incubação e permaneceu por até 72 horas. O cetoconazol inibiu a formação das hifas e o DMSO não interferiu na formação destas, validando as condições experimentais deste estudo. Em conclusão, o composto sintético derivado de alcaloides marinhos foi um potente inibidor da formação de hifas, destacando-se como opção para desenvolvimento de novos agentes antifúngicos.

**Palavras chave:** *Candida albicans*, fator de virulência, inibição de hifas, alcaloides marinhos

**Apoio financeiro:** UFSJ, CNPq, CAPES e FAPEMIG



## **RESUMOS**

**Número: 247**

### **IMMUNOINFORMATICS FOR IDENTIFICATION OF VACCINE TARGETS IN *CRYPTOCOCCUS GATTII* GENOMES**

Luiz Gustavo do Nascimento Rocha<sup>1</sup>, Daniel de Assis Santos<sup>2</sup>, Grace Santos Tavares<sup>1,3</sup>, Jeronimo Conceição Ruiz<sup>1,3</sup>, Daniela de Melo Resende<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Grupo Informática de Biossistemas e Genômica - Instituto René Rachou (IRR) - FIOCRUZ Minas, Belo Horizonte, MG

<sup>2</sup>Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG

<sup>3</sup>Programa de Pós-graduação em Biologia Computacional e Sistemas - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ

Immunoinformatics, a sub-area of bioinformatics, is a science that goals the design of vaccines against pathogens by computational prediction of antigens. This approach is more fast and cheap when compared to conventional vaccinology. Cryptococcosis is a pulmonary infection caused by yeasts of the genus *Cryptococcus* spp. *C. gattii* is a species capable of infecting immunocompetent individuals, unlike *C. neoformans*. In addition, the chemotherapy used to treat it is highly toxic and there are no effective vaccines against the pathogen. The objective of this work is to identify vaccine candidates in proteomes of *C. gattii*. The proteomes of two strains of *C. gattii* (R265 and WM276) and one of *C. neoformans* (JEC21) were obtained for the prediction of epitopes and subcellular localization of predicted proteins. We evaluated the methodology, availability for local installation, among other aspects, from the different computational tools available for the *ab initio* epitopes prediction. As part of the analytical process, there was the development of parser programs in PERL, and the integration of data was made with MySQL for the identification of vaccine targets. Finally, the prevention of cross reaction will be performed with the program BLAST. A total of 20 predictors were evaluated, of which eight were selected according to established criteria: NetMHC and NetCTL for prediction of T CD8+ epitopes, NetMHCII for T CD4+ epitope, BepiPred for B cell epitopes, WoLF PSORT for subcellular localization, TMHMM for transmembrane domains, Sigcleave for signal peptides and FungalRV for adhesins. The preliminary analysis of the data with SQL language revealed four immunogenic proteins from R265, three from WM276 and four from JEC21. They were grouped by the subcellular location and by predicted function. With the approach used in this work, it was possible to integrate in a relational database biological information that can be used for the selection of proteins to compose an effective vaccine.

**Key words:** immunoinformatics, epitope prediction, cryptococcosis, *Cryptococcus gattii*, reverse vaccinology

**Support:** CNPq, FAPEMIG, CAPES, FIOCRUZ, UFMG



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 248**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS LÁTICAS CONTRA CEPAS CLÍNICAS DE *CANDIDA ALBICANS***

GIL, P.O.; ALBUQUERQUE, C.M.; SILVA, A.L.; SILVA, B.P.G.; GRANJEIRO, P.A.; MAGALHÃES, J.T.;  
Laboratório de Microbiologia Básica, UFSJ.

Sabe-se que bactérias Láticas (BAL) possuem capacidade de inibir crescimento de outros microrganismos devido a produção de substâncias como bacteriocinas, ácido lático e peróxido de hidrogênio. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade inibitória de sete cepas de *Lactobacillus* sp contra cinco de *Candida albicans*, sendo quatro isoladas de pacientes com candidíase e uma ATCC. Cerca de 20µL da cultura de BAL previamente crescida em caldo MRS por 24 horas a 37°C foram inoculadas sobre o ágar MRS de forma a se obter um linha de aproximadamente dois centímetros de comprimento de cada bactéria. As placas foram incubadas na estufa em anaerobiose por 48 horas a 37°C. As cepas de leveduras foram crescidas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud e colônias isoladas foram adicionadas em salina para leitura no espectrofotômetro a 595nm, de forma a se obter  $10^6$  células/mL. Em seguida, cerca de  $10^5$  células/ml de cada levedura foi adicionada em 9 mL de Sabouraud semissólido, o qual foi cuidadosamente vertido nas placas de Petri contendo as linhas das bactérias crescidas em MRS. As placas ficaram novamente incubadas por 48 horas. Os halos de inibição foram medidos em milímetros e os resultados expressos de forma qualitativa, de forma que as médias de 6 a 10 mm foram expressos como (+); de 10 a 14 mm (++) ; de 15 a 20 mm (+++); e maior que 20 mm (++++). Todas as bactérias láticas inibiram as leveduras testadas, exceto duas cepas. Dentre as BAL inibitórias, sete cepas apresentaram resultado ++, seis cepas apresentaram resultado +++ e quatro cepas apresentaram resultado ++++.

**Palavras-chave:** Bactérias Láticas, *Candida albicans*, atividade antimicrobiana

**Apoio financeiro:** FAPEMIG, CNPq, UFSJ



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 249**

### **ESPECTROMETRIA DE MASSAS MALDI-TOF COMO FERRAMENTA PARA IDENTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS EM ALIMENTOS**

Castilho, F.P.<sup>1</sup>; Pereira, M.P.M.<sup>1</sup>; Freire, T.T.<sup>2</sup>; Assis, D.C.S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil. <sup>2</sup>Instituto Federal do Norte de Minas Gerais - Campus Salinas, Salinas, MG, Brasil. E-mail: [fernandapontelli@icloud.com](mailto:fernandapontelli@icloud.com)

A indústria de alimentos exige técnicas rápidas, precisas e econômicas para a identificação de micro-organismos, principalmente patogênicos e deteriorantes, a fim de garantir a segurança de seus produtos. A espectrometria de massas (EM) é uma técnica analítica que pode ser aplicada à detecção de várias substâncias, como carboidratos, ácidos nucleicos, proteínas e poluentes ambientais, e em experimentos de lipidômica, proteômica e metabolômica. Na EM, as moléculas são convertidas em íons em fase gasosa, que são separados e identificados de acordo com sua razão massa/carga ( $m/z$ ). Os principais componentes de um espectrômetro de massa são o sistema de inserção de amostras, fonte de ionização, analisador e detector. De acordo com a aplicação, os equipamentos podem contar com diferentes combinações desses componentes, variando principalmente em relação à fonte de ionização, analisador e detector. A análise proteômica consiste no estudo do conjunto das proteínas expressas em uma célula, tecido ou organismo, em um dado momento. Dessa maneira, o proteoma inclui produtos obtidos a partir da tradução de sequências genômicas, além de proteínas resultantes de processos pós-transcricionais e pós-traducionais. A EM tem sido utilizada para a análise proteômica visando à identificação de micro-organismos em diferentes tipos de amostras e os equipamentos empregados nestas análises são constituídos de fontes de ionização MALDI (Matrix Assisted Lazer Desorption Ionization) e analisadores do tipo TOF (Time of Flight). A eficiência da EM MALDI-TOF para o diagnóstico de rotina de micro-organismos em produtos alimentícios já foi comparada em alguns estudos com outras técnicas, como a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e a reação em cadeia da polimerase (PCR), e a EM obteve maior taxa de sucesso para identificação dos micro-organismos em nível de espécie quando comparada às demais técnicas, demonstrando a aplicabilidade da EM para a identificação microbiana.

**Palavras chave:** espectrometria de massas, MALDI-TOF, identificação microbiana, alimentos



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 250**

### **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA *in vitro* DO EXTRATO HEXÂNICO OBTIDO DAS RAIZ DE *Salacia* sp (Celastraceae)**

Cruz, W. S.<sup>1,2</sup>, Lima, W.G.<sup>1</sup>; Ferraz, A.C<sup>2</sup>; Palumbo, J. M. C.<sup>1</sup>; Morais, F. B.<sup>1</sup>; Ferreira, J.M.S.<sup>1</sup>; Soares, A.C.<sup>3</sup>; Magalhães, J.C.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia Médica, UFSJ, Divinópolis, MG. <sup>2</sup>Laboratório de Biologia Molecular e Celular, Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos (DQBIO), UFSJ, Ouro Branco, MG.

<sup>3</sup>Laboratório de Farmacologia da dor e Inflamação, UFSJ, Divinópolis, MG, Brasil. Email: [waleskaob@gmail.com](mailto:waleskaob@gmail.com).

Infecções microbianas são consideradas um problema de saúde pública. A multirresistência aos antimicrobianos disponíveis comercialmente tem tornado a busca por novos agentes antimicrobianos uma necessidade. Diante desse cenário, a investigação do efeito antimicrobiano de espécies vegetais tem se tornado uma alternativa para o desenvolvimento de novos fármacos, visto que, na maioria das vezes, essas espécies já possuem um histórico de uso na medicina tradicional como antibacterianas. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana e a citotoxicidade do extrato hexânico (EHJ) da raiz de *Salacia* sp (Celastraceae). A atividade antimicrobiana foi avaliada por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM), segundo o método de microdiluição em caldo, utilizando-se as estirpes de referência: *Candida albicans* ATCC18804, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 43816, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella oxytoca* ATCC 0182, *Staphylococcus aureus* ATCC 23103, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Bacillus subtilis* ATCC 6051. Após comprovada a atividade antimicrobiana do extrato, foi determinada sua atividade bactericida. Amoxicilina e DMSO foram empregados como controle positivo e negativo, respectivamente. O ensaio de citotoxicidade foi feito utilizando fibroblastos de rim de Macaco Verde (Vero ATCC CCL81). O extrato hexânico apresentou MIC para as Gram-positivas *S. aureus* (15,62 µg/mL), *B. subtilis* (15,62 µg/mL), *S. epidermidis* (15,62 µg/mL). Além disso, apresentou atividade bactericida para *S. aureus* (125 µg/mL) e *B. subtilis* (31,25 µg/mL). Quanto ao ensaio de citotoxicidade, o extrato EHJ apresentou uma CC<sub>50</sub> igual a 26,68 µg/mL, sendo o índice de seletividade obtido igual a 1,71 µg/mL. A partir dos resultados, observa-se que o extrato hexânico obtido a partir das raízes de *S. crassifolia* apresenta atividade antibacteriana contra Gram-positivas, porém com uma citotoxicidade elevada nas células testadas.

**Palavras-Chave:** Atividade antimicrobiana, *Salacia* sp, extrato hexânico, citotoxicidade.

**Apoio financeiro:** Capes, FAPEMIG, UFSJ e CNPq



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 251**

**CARACTERIZAÇÃO DE UM ISOLADO CLÍNICO DE *Prototheca* sp. OBTIDO DE CASO DE PROTOTECOSE SISTÊMICA NO BRASIL**

Duarte-Silva, L<sup>1</sup>; Aurora, I.R.<sup>1</sup>; Mendonza, A. L.<sup>3</sup>; Vilela, R.V.R.<sup>2,3</sup>; Costa, A.O.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Parasitologia Clínica e <sup>2</sup>Laboratório de Micologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte, MG., <sup>3</sup> Biomedical Laboratory Diagnosis, Michigan State University. E-mail: duartesilvaluciana@gmail.com

Os microrganismos do gênero *Prototheca* são algas aclorofiladas encontradas amplamente na natureza e, eventualmente, descritas como agentes patogênicos causadores de infecções cutâneas e sistêmicas em humanos. Embora seja uma infecção rara, a prototecose é de grande importância pelo seu caráter emergente e oportunista, além de seu diagnóstico ser um problema por confundir-se com infecções por leveduras. Desta maneira, um conhecimento mais completo da biologia e fisiologia de *Prototheca* ainda é necessário para esclarecer aspectos de sua patogenicidade. Nesse trabalho, um isolado clínico de *Prototheca* foi caracterizado por critérios biológicos e bioquímicos para identificação da espécie. O isolado foi obtido de paciente HIV positivo com quadro por prototecose sistêmica, originada da disseminação de lesões ulceradas em membros inferiores, com evolução para óbito por sepse. A caracterização morfológica foi realizada por macroscopia de colônias, microscopia e morfometria das formas unicelulares, indicando a espécie *P. wickerhamii*, a mais encontrada em infecções de humanos. A identificação específica foi confirmada por teste de assimilação de carboidratos e sensibilidade ao clotrimazol. A amostra cultivada originalmente em ágar Sabouraud-Dextrose também se adaptou em meio líquido composto por peptona, extrato de levedo e glicose. De apenas seis casos de prototecose descritos no Brasil, cinco tratam-se da forma cutânea e um de forma ungueal. O isolado de *P. wickerhamii* caracterizado neste estudo é o primeiro no país a ser obtido de caso de prototecose cutânea com evolução para quadro sistêmico. Este, portanto, constitui uma importante amostra para estudos futuros, como por exemplo, a investigação de fatores que levam a alga a se estabelecer como patógeno.

**Palavras-chave:** *Prototheca* sp. Prototecose. Diagnóstico. Identificação morfológica. Identificação bioquímica.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 252**

### **EFEITO DE DOIS HETEROCÍCLICOS TIAZÓLICOS NO TRATAMENTO DA CANDIDÍASE ORAL E SISTÊMICA EM MODELO MURINO**

Paula, L.F.J.<sup>1</sup>; de Sá, N.P<sup>1</sup>; Johann, S<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG.

As espécies do gênero *Candida*, em particular a espécie *C. albicans*, são colonizadores considerados inofensivos na cavidade oral, vaginal, intestinal e na microbiota da pele. No entanto, em indivíduos imunocomprometidos, essas leveduras podem se tornar patogênicos oportunistas levando a infecções na mucosa, além de serem capazes de causar infecções sistêmicas graves. Este trabalho objetiva o estudo da atividade antifúngica de dois heterocíclicos tiazólicos no tratamento da candidíase oral e sistêmica em modelo murino. Foram utilizados dois heterocíclicos tiazólicos, denominados RI06 e RN104 em modelo de candidíase sistêmica e somente RI06 em modelo de candidíase oral. Para a candidíase oral, foram usados camundongos C57BL/6 previamente tratados com tetraciclina e imunossuprimidos com prednisolona. Para a infecção, foram utilizados swabs contendo o inóculo da levedura na região posterior da língua dos camundongos. O tratamento foi realizado de 12 em 12 horas na dose de 100 mg/kg durante 4 dias e, após, a língua e os rins foram usados para quantificar as UFCs. Na candidíase sistêmica foram utilizados camundongos C57BL. A infecção se deu via veia caudal e os tratamentos foram realizados na dose de 10 mg/kg de 12 em 12 horas ao longo de 5 dias. Em seguida, os animais foram sacrificados e os rins removidos para a quantificação das UFCs. Com isso, observou-se que não houve variação significativa no peso ou outra alteração aparente decorrente da infecção na candidíase sistêmica e oral. No modelo sistêmico houve uma redução significativa ( $p<0.05$ ) da carga fúngica obtida dos rins dos animais tratados com os dois tiazóis. No modelo oral foram recuperadas leveduras apenas da língua dos animais e o tratamento com a substância RI06 reduziu significativamente ( $p<0.01$ ) a carga fúngica na língua, comparado ao controle, que não recebeu tratamento. Este trabalho aponta para o potencial terapêutico desses dois compostos tiazólicos para o tratamento da candidíase sistêmica e oral.

**Palavras Chave:** Antifúngico, *Candida albicans*, modelo murino.

**Apoio financeiro:** CNPq.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 253**

### **THE BOOM OF YELLOW FEVER: CONCERNING ASPECTS OF EPIDEMICS AND EPIZOOTICS IN MINAS GERAIS, BRAZIL, IN 2017**

LÍVIA SACCHETTO<sup>1</sup>, IZABELA MAURÍCIO DE REZENDE<sup>1</sup>, ÉRICA MUNHOZ DE MELLO<sup>2</sup>, MATHEUS SOARES ARRUDA<sup>1</sup>, THAIS ALKIFELES COSTA<sup>1</sup>, ANA LUIZA CAMPOS CRUZ<sup>1</sup>, YELLOW FEVER GROUP<sup>3</sup>, BENOIT DE THOISY<sup>4</sup>, GILIANE DE SOUZA TRINDADE<sup>1</sup>, BETÂNIA PAIVA DRUMOND<sup>1</sup>

<sup>1</sup> UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais, <sup>2</sup> CCZBH - Centro de Controle de Zoonoses, <sup>3</sup> UFMG-MG/IBAMA-CETAS-BH/IRR-FIOCRUZ-MG - UFMG-MG/IBAMA-CETAS-BH/IRR-FIOCRUZ-MG, <sup>4</sup> Institut Pasteur - Institut Pasteur de la Guyane. E-mail: [livia.sacchetto@gmail.com](mailto:livia.sacchetto@gmail.com)

In 2017, Brazil faced the largest epidemics and epizootics of yellow fever (YF) in recent years. When we analyzed the epidemics in Minas Gerais (MG) state, the pattern fits the expected one during YF epidemics, apart from the huge number of cases and deaths: 1,147 cases (446 confirmed) and 209 deaths (159 confirmed). In contrast, the epizootics had some uniqueness, being widespread in MG (confirmed in 121 and suspected in 351 municipalities) in rural and urban areas. We received, 343 non-human primates (NHP) carcasses to be identified, processed and analyzed. Total viral RNA was extracted from liver (RNAeasy Mini Kit - Qiagen) and used for qPCR with primers and probe for *Yellow fever virus* (YFV) (GoTaq®Probe 1-StepRT-qPCR Promega). From 100 samples tested, 27 (27%) were positive. YFV was detected in *Alouatta* sp. (3/4), *Callicebus* sp. (3/4), *Callithrix geoffroyi* (4/6) and *Callithrix penicillata* (15/33), in rural (19%) and urban areas (30%). Phylogenetic analysis indicated that the YFV from detected here in NHP clustered together with other ones from the current outbreak. The analysis reinforced the importance of vaccination to prevent YF in humans, especially in rural areas. YFV was detected in NHP from 7 mesoregions of MG, confirming new epizootics. The data showed the extensive occurrence of YFV in MG and worryingly, the presence of YFV in NHP in urban areas, including big urban centers, as Belo Horizonte. The role of the infected NHP inserted in urban matrixes in virus cycle should be carefully addressed, since it may be a source of virus in urban areas. Further spatial, temporal and phylogeographical analysis will be done, and other studies are vital to measuring the impact of YF epizootics in NHP population. YELLOW FEVER GROUP (other members): UFMG: F.Perini, F.Santos, A.Paglia, A.I.A.Prado, R.G.A.V.Stump, R.L.Massara, A.M.O.Pascoal, E.G.Kroon; IBAMA/CETAS-BH/MG: E.P.Teixeira, C.Barreto, D.A.R.Vilela, L.S.S.Matos; IRR-FIOCRUZ-MG:P.A.Alves.

**Keywords:** *Yellow fever virus*, Yellow fever, Zoonosis, Non-Human Primates, Epizootics.  
**Financial Support:** FAPEMIG, CNPq, CAPES, ERDF from European Commission, and Institut Pasteur de la Guyane.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 254**

### **PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES DE IMUNOGLOBULINAS FC $\gamma$ DURANTE INFECÇÃO PULMONAR EXPERIMENTAL PELO FUNGO PATOGÊNICO *Paracoccidioides brasiliensis***

Thereza Raquel Gomes Veloso<sup>1</sup>; Patrícia Campi Santos<sup>2</sup>; Carla Pataro<sup>3</sup>, Daniele da Glória de Souza<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Graduada em Biomedicina - Centro Universitário de Belo Horizonte – UniBH, 2017. Belo Horizonte, MG. [thequel.veloso@gmail.com](mailto:thequel.veloso@gmail.com). <sup>2</sup>Doutora em Microbiologia, ICB/UFMG, 2017. Pesquisadora do Laboratório de Interação Microrganismo-Hospedeiro do Departamento de Microbiologia/UFMG. Belo Horizonte, MG. [patycampi@gmail.com](mailto:patycampi@gmail.com). <sup>3</sup> Professora Doutora do Departamento de Ciencias Biológicas e da Saúde – ICBS do Centro Universitário de Belo Horizonte. MG. [carla.pataro@yahoo.com.br](mailto:carla.pataro@yahoo.com.br). <sup>4</sup> Professora Doutora do Departamento de Microbiologia – ICB/UFMG. Belo Horizonte, MG. [souzadg@gmail.com](mailto:souzadg@gmail.com).

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) é um fungo dimórfico, a 37°C se comporta como levedura, e a 25°C tem caráter filamentoso. Este fungo é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), micose sistêmica endêmica na América Latina, onde estima-se a ocorrência de 3 casos por 100 mil habitantes. Ocorre mais em homens do que em mulheres, pois o hormônio feminino 17-β-estradiol torna o fungo incapaz de se transformar em levedura, caráter essencial para infecção. Estudos mostram que a resposta imune Th2 modulada por anticorpos específicos é prejudicial. Porém, não se tem caracterizado o papel das imunoglobulinas e de seus receptores na resposta imune inata contra o fungo. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi caracterizar a participação de anticorpos e receptores de imunoglobulinas Fc $\gamma$ R na resposta imune. Foram utilizados camundongos selvagens da linhagem C57BL/6 e deficientes dos receptores Fc $\gamma$ RIIb e Fc $\gamma$ RIII. Os animais receberam inóculo intratraqueal de 1x10<sup>6</sup> leveduras viáveis de *P. brasiliensis*. Os animais deficientes de Fc $\gamma$ RIIb apresentaram 100% de mortalidade, associada ao acúmulo intenso de leucócitos nos pulmões e carga fúngica aumentada. A utilização de inóculo menor (1x10<sup>5</sup> leveduras) confirmou a resposta inflamatória exacerbada, e acúmulo de neutrófilos e eosinófilos nos pulmões, como um possível mecanismo de suscetibilidade dos animais deficientes do receptor Fc $\gamma$ RIIb. Estes resultados apontam para a importância dos receptores Fc $\gamma$ , principalmente do receptor inibitório Fc $\gamma$ RIIb no controle da inflamação e nos mecanismos efetores de resposta do hospedeiro na infecção pelo fungo patogênico *P. brasiliensis*.

**Palavras-chave:** *P. brasiliensis*, Infecção, Pulmão, Imunoglobulinas, receptores Fc $\gamma$ , resposta imune

**Apoio Financeiro:** CNPq.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 255**

**ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE *Acanthamoeba castellanii* EM AGENTES DE DERMATOFITOSE.**

Faria, L. V<sup>1</sup>; Carmo, P. H. F<sup>1</sup>; Costa, M. C<sup>1</sup>; Baltazar, L. M<sup>2</sup>; Santos, D. A<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Micologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil; <sup>2</sup>Laboratório de Interações Microrganismo-Hospedeiro, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: lvf2090@gmail.com

Dermatofitoses são infecções fúngicas que afetam a camada superficial da pele de humanos e animais. Dentre os agentes etiológicos mais prevalentes nessas infecções estão as espécies *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton interdigitale* e *Microsporum gypseum*. As amebas de vida livre do gênero *Acanthamoeba* apresentam ampla distribuição ambiental e podem ser consideradas predadoras naturais de fungos do ambiente. Neste trabalho nós cogitamos a hipótese de que estas amebas podem interagir com os dermatófitos e objetivamos investigar a capacidade de *A. castellani* de fagocitar conídios de *T. rubrum*, *T. interdigitale* e *M. gypseum*. Foi realizado um ensaio de fagocitose para verificação de um perfil cinético de internalização dos fungos nos tempos de 1, 4 e 24 horas nas condições: sem Neff, infecção prévia a adição de Neff e em meio Neff. A capacidade fagocítica foi dada pelo percentual de células de amebas total em relação aos fungos internalizados. Enquanto para *T. rubrum* e *M. gypseum* houve um aumento da internalização em função do tempo nas condições sem Neff e infecção prévia a Neff; para *T. interdigitale*, observou-se uma manutenção e/ou diminuição no perfil de internalização. Na infecção em meio Neff, houve um aumento para *T. rubrum* e *M. gypseum* entre 1 e 4 horas. Já para *T. interdigitale*, a taxa de fagocitose se manteve nos três tempos. O perfil de germinação de conídios foi similar ao de internalização: houve aumento para *T. rubrum* e *M. gypseum* e diminuição para *T. interdigitale*. A maior germinação de conídios em hifas no interior da ameba aconteceu para *T. rubrum* em 24 horas. O encistamento da ameba, induzido pela adição de meio Neff aumentou a taxa de fagocitose e a germinação de conídios para *T. rubrum* e *M. gypseum* e diminuiu para *T. interdigitale*. Assim, demonstrou-se a capacidade de *A. castellani* internalizar conídios de maneira rápida. Novos experimentos serão realizados para avaliar possíveis modificações em fatores de virulência após o contato com ameba.

**Palavras chave:** dermatófitos, fagocitose, ameba.

**Apoio financeiro:** FAPEMIG, CAPES e CNPq.



## **RESUMOS**

**Número: 256**

### **GENÔMICA COMPARATIVA DE VIAS METABÓLICAS DE *Cryptococcus* spp.**

Gouveia-Eufrasio, L.<sup>1,2</sup>; Tavares, G.S.<sup>2</sup>; Gonçalves, L.O<sup>2</sup>; Ruiz, J.C.<sup>2</sup>; Santos, D.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Micologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. <sup>2</sup>Grupo Informática de Biossistemas e Genômica, Instituto René Rachou, Fiocruz, Belo Horizonte, MG. E-mail: [milagouveia@yahoo.com.br](mailto:milagouveia@yahoo.com.br)

*Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* são os principais agentes da criptococose, uma micose sistêmica que acomete os pulmões e pode migrar para o sistema nervoso central. Essas espécies compartilham quase todos os fatores de virulência. Entretanto, diferentes perfis de hospedeiros são observados para esses micro-organismos e uma hipótese poderia ser diferenças no metabolismo desses patógenos. A bioinformática representa uma área interdisciplinar de estudo que viabiliza a análise comparativa e integrativa de dados biológicos de origem diversa. Dentro deste contexto, abordagens analíticas computacionais permitem a predição de vias metabólicas de organismos e a comparação inter espécies. Assim, o objetivo deste estudo foi o de caracterizar, *in silico*, vias metabólicas de *C. neoformans* e *C. gattii*, além de caracterizar a presença de sequências que codificam fatores de virulência desses fungos, por meio da análise de genomas disponíveis em bancos de dados de domínio público. Três genomas de *C. neoformans* e três de *C. gattii* com anotação genômica e funcional foram utilizados. Os proteomas preditos foram extraídos dos genomas e o mapeamento de vias metabólicas foi realizado pelo programa Blast2GO. Das 29 vias mapeadas, 16 foram comuns a todos os organismos. Os resultados referentes à análise de agrupamento demonstraram que praticamente todas as proteínas associadas à virulência pertencem ao *core genome*. Também foi observado que proteínas associadas à virulência estão envolvidas em diversos processos biológicos. Além disso, foi evidenciado que a linhagem *C. neoformans* H99 foi a única a possuir enzimas associadas à virulência mapeadas na via de fosforilação oxidativa, sendo essa observação um possível objeto de estudos posteriores. Tendo em vista os resultados observados, concluímos que estudos envolvendo vias metabólicas de *Cryptococcus* spp. são de extrema importância para uma melhor compreensão acerca dos mecanismos envolvidos na virulência desses patógenos.

**Palavras chave:** *Cryptococcus* spp., vias metabólicas, virulência, bioinformática.

**Apoio financeiro:** Capes, CNPq, FAPEMIG.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 257**

### **HISTOLOGICAL ANALYSIS OF CARDIAC TISSUE OF BALB / C MICE AFTER *P. brasiliensis* INFECTION.**

Oliveira, J.A.C.<sup>1</sup>; Morais, E. A. M.<sup>2</sup>; Melo, E. M.<sup>2</sup>; Cunha, S. C.<sup>2</sup>; Martins, E. M. N.<sup>3</sup>; Carneiro, C. M. C.<sup>2</sup>; Sá, L. N. S.<sup>2</sup>; Góes, A. M.<sup>2</sup>; Stoianoff, M. A. R.<sup>1</sup>.

Laboratório de Micologia, ICB - UFMG<sup>1</sup>; Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, ICB - UFMG.  
Laboratório de Química dos Nanoestruturados, CDTN/CNEN<sup>3</sup>.

E-mail: junnia@outlook.com

Paracoccidioidomycosis is a systemic disease, endemic in Latin America, caused by dimorphic fungi of *Paracoccidioides* genus. Even though the primary pathway of infection is pulmonary, by inhalation of conidia, several anatomical sites may be affected by lymphoematogenic dissemination, including the heart. Studies demonstrate the complexity of the *P. brasiliensis* caused disease and reveal a necessity to investigate the infection sites these microorganism, because the involvement may be underdiagnosed. The aim of this work was to identify and characterize fungal colonization in the heart of *P. brasiliensis* infected mice. BALB/c mice were infected with virulent Pb18 strain of *P. brasiliensis* that was euthanized at 15, 30 and 60 days after infection. The heart was removed for some histological analysis using HE to detect inflammatory infiltrat and Trichrome of Masson to evaluate the presence of collagen fibers around the fungus. The histological findings revealed a granulomatous inflammatory infiltrate presenting collagen fibers around the fungi. The results obtained in the work reveal that the cardiac tissue present an infection profile similar to those observed in the literature with pulmonary tissue. The fungus has a hematogenous dissemination capacity to the cardiac tissue, colonize and to generate inflammatory responses characteristic of the disease such as a formation of granulomas rich in collagen fibers, which may compromise cardiac function and aggravate the patient's clinical condition. Thus, a characterization of cardiac tissue infection by *P. brasiliensis* may better target the diagnosis of cardiac problems associated with PCM and indicate more adequate therapeutic measures for the control and treatment of the disease.

**Palavras-chave:** Paracoccidioidomycosis; PCM dissemination; cardiac tissue; *Paracoccidioides brasiliensis*; histological analysis.

**Apoio financeiro:** CNPq, CAPES e FAPEMIG



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 258**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE UMA CHALCONA SINTÉTICA INÉDITA SOBRE A FORMAÇÃO DE HIFAS EM *Candida albicans***

Palumbo, M.C.J. <sup>1\*</sup>, Andrade, J.T.<sup>1</sup>, Santos, F.R.S.<sup>2</sup>, Silva, M.K.P.<sup>1</sup>, Lima, W.G.<sup>1</sup>, Cruz, W.S.<sup>1</sup>, Nascimento, L.A.A<sup>1</sup>, Morais, F.B.<sup>1</sup>, Villar J.A.F.P.<sup>2</sup>, Ferreira, J.M.S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia Médica, <sup>2</sup>Laboratório de Síntese Orgânica, Universidade Federal de São João Del-Rei, Campus Centro Oeste Dona Lindu, MG, Brasil. E-mail: [julianapalumbo@yahoo.com.br](mailto:julianapalumbo@yahoo.com.br)

Espécies de *Candida* estão associadas a uma elevada taxa de morbi-mortalidade. O potencial patogênico de *Candida albicans* está relacionado com mecanismos que envolvem diversos fatores de virulência, que incluem a transição morfológica entre levedura e hifa. As hifas são estruturas que exercem importante papel na invasão da mucosa e torna as leveduras resistentes à ação de células de defesa como macrófagos e neutrófilos. Compostos sintéticos da classe chalcona têm sido associados a diversas atividades farmacológicas como antitumoral, anti-inflamatória e antifúngica Neste contexto, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar o efeito de uma chalcona sintética inédita, denominada LZ46, sobre a formação de hifas em uma amostra padrão de *C. albicans* ATCC 10231. Para a avaliação deste efeito, a LZ46 foi avaliada em concentrações de 7,8 a 31,25 $\mu$ g/mL de acordo com a Concentração Inibitória Mínima. A *Candida albicans* foi cultivada em microplacas contendo um indutor de formação de hifa (soro fetal bovino) e as microplacas foram incubadas a 37°C por 24, 48 e 72 horas. Nessas intervalos de tempo, lâminas a fresco e foram preparadas e observadas ao microscópio de luz no aumento de 400X. Os controles de crescimento, de esterilidade, do solvente (DMSO) e de antifúngico (cetoconazol) também foram visualizados e analisados. Os resultados mostraram que a chalcona LZ46 foi capaz de reduzir a formação de hifas de *C. albicans* ATCC 10231 após 24 horas, nas concentrações de 15,6 e 31,25 $\mu$ g/mL. Quando comparada ao controle de células não tratadas, este resultado foi mantido após 48 e 72 horas de incubação. Em suma, a chalcona LZ46 mostrou promissora atividade na redução da formação de hifas, oferecendo subsídios que indicam a possibilidade de sua utilização como um protótipo em tratamentos farmacológicos de infecções fúngicas sistêmicas.

**Palavras chaves:** *Candida albicans*, hifa, fatores de virulência, chalcona sintética.



## **RESUMOS**

**Número: 259**

### **PREVALÊNCIA DO HPV16 EM TECIDOS CERVICais OBTIDOS DE MULHERES COM ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS**

Aguiar, M.F.G.<sup>1</sup>; Alves, H.C.<sup>1</sup>; Peixoto, L.R.<sup>1</sup>; Sousa, V.B.P.<sup>1</sup>; Tafuri, A.<sup>1</sup>; Vago, A.R.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Patogênese Molecular, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

E-mail: mfguimaraesaguiar@gmail.com

O câncer de colo de útero é frequentemente associado à infecção persistente pelo Papilomavírus Humano (HPV). É um dos principais tipos de câncer que acomete a população feminina sendo responsável por um alto índice de óbitos. A presença do HPV está relacionada ao desenvolvimento de alterações celulares que vão desde as neoplasias intraepiteliais cervicais (NICs) até o carcinoma cervical. Apenas um grupo de HPVs, denominados tipos de HPV de alto risco (AR) está envolvido com o desenvolvimento de condições pré-malignas ou malignas, principalmente os tipos 16 e 18 seguido pelos tipos 31, 33, 35, 45, 52 e 58. O objetivo deste estudo foi investigar a prevalência do DNA-HPV16 em biópsias de tecidos incluídas em parafina obtidas de mulheres residentes na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, e que apresentaram diagnóstico histopatológico de NICII e câncer. Examinamos a prevalência do DNA-HPV16 em 49 amostras cervicais, 14 dessas diagnosticadas como NICII e 35 portadoras de câncer. As amostras foram inicialmente submetidas a um protocolo de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional para se investigar a presença do DNA-HPV16. Posteriormente, as amostras negativas foram submetidas a um protocolo de PCR mais sensível (Hemi-nested PCR) para aumentar a eficácia da detecção do DNA viral. A prevalência geral do DNA-HPV16 foi de 92% (45/49) entre as amostras analisadas, com 86% (12/14) de positividade em amostras com NICII e em 94% (33/35) das amostras de câncer cervical. Nossos resultados apontaram uma alta incidência da infecção pelo HPV16 na população de mulheres analisadas, portadoras de graves lesões cervicais, e reforçam a necessidade de adoção de medidas de proteção para se prevenir da infecção por HPV, em especial com o tipo de AR 16, o mais oncogênico dos tipos. Se for prontamente diagnosticado, o câncer cervical apresenta um dos maiores potenciais de prevenção e cura.

**Palavras-chave:** Câncer cervical, NIC, HPV-16, HPV de alto risco, PCR.

**Apoio Financeiro:** FAPEMIG e CNPq.



## **RESUMOS**

**Número: 260**

### **O COMPONENTE ATF6 DA VIA UPR PROMOVE A REPLICAÇÃO DOS VÍRUS VACCÍNIA ATRAVÉS DA EXPRESSÃO DE CHAPERONAS DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO**

Leão, T. L.<sup>1</sup>; Silva, A. M.<sup>2</sup>; da Fonseca, F. G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Virologia Básica e Aplicada, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG. <sup>2</sup>Laboratório de Genes inflamatórios, Departamento de Morfologia, ICB, UFMG. E-mail: [thiagolleao@gmail.com](mailto:thiagolleao@gmail.com)

As respostas das células aos diferentes estresses são mecanismos eficientes que previnem e combatem o acúmulo de macromoléculas danificas nas células e também reforçam as defesas do hospedeiro contra patógenos. O vírus *Vaccínia* (VACV) é um vírus envelopado, de DNA dupla fita linear, pertencente à família *Poxviridae* que evoluiu numerosas estratégias para manipular as respostas do hospedeiro aos estresses controlando a sobrevivencia da célula e potencializando o seu sucesso replicativo. Neste estudo, investigamos a ativação da via de sinalização de resposta a proteínas mal formadas (UPR) pela linhagem virulenta – *Western Reserve* (WR) - ou a linhagem não virulenta - *Modified Vaccinia Ankara* (MVA) - de VACV e descobrimos que ambas modulam a via UPR, desencadeando a expressão de chaperonas do retículo endoplasmático através da sinalização por ATF6 enquanto evita a ativação dos outros componentes da via, IRE1-XBP1 e PERK. Através de ensaios RT-PCR RFLP e qPCR, detectámos uma regulação negativa do processamento do mRNA de XBP1 em células infectadas por VACV. Através de ensaios de genes repórteres para o componente ATF6, por outro lado, observamos sua translocação para o núcleo das células infectadas e um robusto aumento na sua atividade transcracional, parecendo ser importante para a replicação do vírus; curvas de multiplicação viral de ciclo único da linhagem WR em MEFs ATF6-nocaute mostraram uma redução no rendimento viral em comparação com as MEFs-selvagem controle. Quanto a PERK, a replicação em MEFs PERK-nocaute não mostrou diferenças significativas no nível de rendimento viral. Ensaios de qPCR mostraram que a expressão da chaperona BiP é regulada positivamente durante a infecção por ambos VACV de uma maneira dependente de ATF6. Nós especulamos que a expressão dessa chaperona contribui para a deficiência de replicação de vírus em células ATF6-nocaute.

**Palavras-Chave:** Vírus Vaccínia, estresse celular, UPR, ATF6

**Apoio Financeiro:** CNPq, CAPES, FAPEMIG, INCTV e CTVacinas



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 261**

**PREVALÊNCIA DO DNA DOS HPVs 35 E 45 DE ALTO RISCO ONCOGÊNICO EM AMOSTRAS CERVICAIAS DE MULHERES DIAGNOSTICADAS COM CÂNCER CERVICAL**

**Larissa Rodrigues Peixoto<sup>1</sup>**, Daniele de Souza Camargos<sup>1</sup>, Vitor Bruno Pereira Sousa<sup>1</sup>, Matheus Felipe G. Aguiar<sup>1</sup>, Wendel H. Duarte<sup>1</sup>, Annamaria Ravara Vago<sup>1</sup> e Alexandre Tafuri<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Patogênese Molecular, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG. E-mail: larissarodrigues03@gmail.com

O câncer cervical (CC) é uma das causas mais comuns de morte em mulheres de todo o mundo. Infecção persistente por HPVs de alto risco (AR) constitui o principal fator para o desenvolvimento do CC e de lesões pré-neoplásicas classificadas como lesões intraepiteliais escamosas (SILs) de baixo grau (LSIL) e alto grau (HSIL). Acima de 150 tipos de HPV já foram identificados sendo que os HPVs de AR são representados pelos tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56 e 58. Estudos recentes apresentam o desenvolvimento da vacina direcionada contra VLPs (vírus-like particle) da proteína L1 do capsídeo viral dos HPVs 6/11 (baixo risco) e dos tipos de AR (16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 e 58). Porém, há uma escassez de dados sobre a prevalência do HPVs 35 e 45 entre as mulheres de todo o mundo, inclusive da população brasileira. O objetivo deste trabalho foi investigar a prevalência dos HPV-AR 35 e 45 em amostras de câncer cervical incluídas em parafina provenientes de mulheres de Belo Horizonte, MG, Brasil. A análise da prevalência do DNA dos HPVs 35/45 foi realizada por meio de PCR convencional, em 40 amostras de CC. Os resultados mostram que 60% dessas amostras de câncer foram positivas para o HPV 35 e 12,5% para o HPV 45. Observamos portanto, uma alta incidência de infecção por HPV35 e 45 entre as mulheres analisadas. Nossos dados enfatizam a relevância da inclusão dos tipos HPV35 e 45 em vacinas profiláticas para prevenir a disseminação desse tipo de AR entre as mulheres sexualmente ativas.

**Palavras Chaves:** Papilomavírus Humano, HPVs 35 e 45, Câncer Cervical, Vacinas profiláticas e PCR.

**Apoio Financeiro:** Pronoturno – PROGRAD, UFMG; FAPEMIG e CNPq.



## **RESUMOS**

**Número: 262**

### **CONSTRUÇÃO DE MVA RECOMBINANTE QUE CODIFICA PROTEÍNA QUIMÉRICA MULTIEPITOPO BASEADO NA PROTEÍNA HBZ DO HTLV-1, POTENCIAL CANDIDATO A VACINA TERAPÊUTICA**

Prado, J. L.C.<sup>1</sup>; Pinho, T. M. G.<sup>1</sup>; Fonseca, F. G.<sup>1</sup>; Barbosa-Stancioli E. F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Virologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG.

Email: [joaolcprado@gmail.com](mailto:joaolcprado@gmail.com)

O *Human T-cell lymphotropic virus 1* (HTLV-1) é um retrovírus que infecta cerca de 5-10 milhões pessoas no mundo. Cerca de 5% desses portadores desenvolverão doenças graves. Duas patologias estão associadas com o HTLV-1: a leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL) e a mielopatia associada ao HTLV-1/Paraparesia espástica tropical (HAM/TSP). Apesar de ambas as doenças apresentarem prognósticos muito ruins, não existe nenhum tratamento específico para a infecção. Estudos mostraram que resposta celular citotóxica contra proteína viral HBZ, importante na cronificação da infecção e no desenvolvimento das doenças, é capaz de controlar a infecção. Devido ao impacto da infecção por HTLV-1, este trabalho objetivou a construção de um vírus *Modified Vaccinia Ankara* (MVA) recombinante codificando uma proteína quimérica contendo epítopes da proteína HBZ, como um potencial candidato a vacina terapêutica. Os epítopes foram selecionados por análise *in silicio* e revisão de literatura. O gene da proteína quimérica foi sintetizado comercialmente em plasmídeo pCloneEZ e foi amplificado em *E. coli* XL10-Gold. O gene foi subclonado no plasmídeo de transferência pLW44, pelas enzimas de restrição SmaI e PstI. Vírus MVA recombinantes foram gerados através de recombinação homóloga entre MVA selvagem e pLW44 em células de fibroblastos de galinha (CEFs). Os clones recombinantes foram selecionados pela expressão de GFP, por PCR e RT-PCR. Duas proteínas químéricas foram construídas (HBZ-CHI e HBZp-CHI), que diferem na presença de um peptídeo sinal (p). A presença de fragmentos de tamanho de 294pb e 366pb na restrição enzimática do pLW44, confirmou a subclonagem. A PCR do DNA viral gerou amplicons de tamanhos de 624pb e 692pb, e a RT-PCR do RNA viral gerou amplicons de 267pb, ambas amplificações confirmam a construção do MVA recombinante e transcrição da sequência codificadora. Estudos futuros serão conduzidos para confirmar a eficácia desses vírus como vacina terapêutica para o HTLV-1.

**Palavras chave:** HTLV-1, MVA, HBZ, Proteína Químérica, Vacina terapêutica

**Apoio financeiro:** CNPq, FAPEMIG e PRPq-UFMG



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 263**

### **ANNEXIN-A1 PROMOTE TIMELY RESOLUTION OF INFLAMMATION DURING DENGUE VIRUS INFECTION**

Sousa, C.D.F.<sup>1</sup>; Bambirra, J.L.<sup>1</sup>; Moreira, T.P.<sup>1</sup>; Queiroz, V.F.<sup>1</sup>; Camargos, V.N.<sup>1</sup>; Queiroz-Junior, C.M.<sup>3</sup>; Tavares, L.<sup>2</sup>; Perretti, M.<sup>4</sup>; Teixeira, M.M.<sup>2</sup>; Souza, D.G.<sup>1</sup>; Costa, V.V.<sup>3</sup>.

1- Depto Microbiologia- ICB/UFMG; 2- Depto Bioquímica e Imunologia – ICB/UFMG; 3- Depto Morfologia – ICB/UFMG; 4- Queen Mary University of London – UK  
E-mail: [carlafsousa@outlook.com](mailto:carlafsousa@outlook.com)

Dengue is the most important arboviral disease worldwide. Is estimated an occurrence of 400 million infections by one of the four *Dengue virus* (DENV) serotypes every year. Severe disease is associated with a systemic inflammatory response, thrombocytopenia, hemoconcentration and increase in vascular permeability. Resolution of inflammation is an active process leading to restoration of tissue homeostasis. Here, we studied the role of Annexin A1 (AnxA1), a glucocorticoid-regulated protein that has anti-inflammatory and proresolving actions, in resolution of acute *Dengue virus* (DENV) infection. ELISA analysis of AnxA1 levels in serum of patients infected by DENV revealed reduced levels this protein in comparison to heath individuals. Similarly, AnxA1 levels were significantly reduced in the serum of wild type (WT) mice infected by a clinical isolate of DENV-2. Accordingly, DENV-2 inoculation to WT mice resulted in some signs of disease manifestation, as represented by thrombocytopenia, hemoconcentration and increased vascular permeability in liver after 24hs and 48hs of DENV-2 inoculation. Interestingly, all those parameters of disease were massively exacerbated in Anx-A1-/- mice and most interestingly, disease lasted longer, remaining until 72hs after infection. To confirm the phenotype, FPR2-/- mice, which are deficient to the Anx-A1 receptor, were infected by DENV-2 and also developed a markedly disease manifestation in comparison to WT-infected littermates. Finally, pretreatment of mice with AnxA1-active N-terminal peptide (Ac2-26) significantly decreased all DENV-induced parameters of disease manifestation. Therefore AnxA1 plays a crucial role in the context of acute DENV infection by promoting timely resolution of inflammation.

**Keywords:** Dengue; Inflammation; Annexin.

**Financial support:** CNPq, FAPEMIG , CAPES, INCT em dengue and PRONEX.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 264**

### **ANTIVIRAL ACTIVITY OF MAPK INHIBITORS: IMPROVEMENTS FOR DENV, ZIKV AND YFV**

Valencia HJ<sup>1,2</sup>; Oliveira LC<sup>1,2</sup>; Trindade GS<sup>2</sup>; Abrahão JS<sup>2</sup>; Ferreira PCP<sup>2</sup>; Kroon EG<sup>2</sup>; Bonjardim CA<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Transdução de Sinal, <sup>2</sup>Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, ICB, UFMG, Belo Horizonte, MG  
hugovalencia007@gmail.com

As part of an ongoing investigation in the Signal Transduction Group from the ‘Laboratório de Vírus’ at ICB-UFMG, we are testing cancer-developed kinase inhibitors to reduce *Flavivirus* *in vitro* multiplication. Actually, viruses need to activated and modulate Cell Signaling Pathways in order to complete a successful multiplication cycle. That is why using inhibitors design to counteract constitutive kinase activation in cancer has shown good results as antivirals. Our group has already shown the effect of MAPK pathway inhibitors in DENV; reducing viral titers in more than 10-fold *in vitro*, and protecting infected mouse from lethal viral doses. Now, due to the urgent public health priority, we are including ZIKV and YFV for testing. Results indicate that a specific MAPK inhibitor reduces ZIKV titter 1000-fold and YFV titter 100-fold with 24h treatment, *in vitro*. Furthermore, the team last breakthrough exhibits a higher effect of inhibitors when functionalized with an encapsulating excipient, which forms a reversible complex with the inhibitor, enhancing solubility and bioavailability. In the long run, these results bring us closer to our goal of finally find a treatment to *Flavivirus* infections. Highlighting that, all side effects found in long-term cancer therapy are undermined when endorsing treatment for a viral acute infection.

**Keywords:** DENV, ZIKV, YFV, MAPK inhibitor.

**Financial support:** CNPq, CAPES, FAPEMIG



## **RESUMOS**

**Número: 265**

### **PREVALÊNCIA DO DNA-HPV EM AMOSTRAS DE TECIDO CERVICAL OBTIDOS DE MULHERES COM ALTERAÇÕES HISTOPATOLOGICAS**

Alves, H.C.<sup>1</sup>; Aguiar, M.F.G.<sup>1</sup>; Peixoto, L.R.<sup>1</sup>; Sousa, V.B.P.<sup>1</sup>; Tafuri, A.<sup>1</sup>; Vago, A.R.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Patogênese Molecular, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

E-mail: healves.cristina@gmail.com

O emprego de técnicas moleculares para análise de tecidos incluídos em parafina (PETs) constitui uma estratégia útil e valiosa em pesquisa, especialmente para realização de estudos retrospectivos. Devido à sua simplicidade técnica, reprodutibilidade e sensibilidade, a Reação de PCR é considerada uma metodologia eficiente e adequada para amplificação de sequencias de DNA alvo em tecidos humanos parafinados. O papilomavírus humano (HPV) é considerado o principal agente etiológico do câncer cervical, e de suas lesões precursoras categorizadas como Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) graus 1, 2 e 3. Acima de 99% das amostras de câncer de colo podem exibir DNA do HPV. O objetivo deste estudo foi investigar a prevalência do DNA-HPV em amostras cervicais parafinadas procedentes de um grande Laboratório de Anatomia Patológica de Belo Horizonte, MG. As 49 amostras cervicais foram obtidas por biópsia e tiveram seu diagnóstico histopatológico confirmado de forma independente por três patologistas certificados, sendo os casos correspondentes a 14 amostras de NIC2 e a 35 amostras de câncer cervical. A pesquisa do DNA-HPV foi realizada por PCR utilizando-se os iniciadores GP5+/GP6+. Posteriormente, as amostras negativas foram submetidas a um protocolo de detecção mais sensível e eficiente (Nested-PCR). A amplificação do gene β-globina foi utilizada para se avaliar a integridade das amostras de DNA extraídas, sendo positiva em 100% das amostras de DNA. Setenta e oito por cento (38/49) das amostras analisadas foram positivas para o DNA de HPV, sendo que 79% (11/14) das amostras de NIC2 e 77% (27/35) das amostras de câncer apresentaram amplificação positiva p/ o DNA-HPV. Nossos resultados demonstraram alta prevalência de infecção por HPV em tecidos apresentando alterações cervicais pré-invasoras (NIC) e invasoras (câncer), e sugerem que pacientes com NIC2 portadoras do HPV necessitariam de acompanhamento clínico mais rigoroso, a fim de se evitar uma progressão ao câncer invasor.

**Palavras-chave:** Câncer cervical, Neoplasia Intraepitelial Cervical, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Nested-PCR.

**Apoio Financeiro:** CNPq e FAPEMIG.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 266**

### **DEVELOPMENT OF A SEMI-NESTED PCR FOR *Zikavirus* DETECTION: FROM STANDARDIZATION TO VIRAL DETECTION IN PATIENTS**

Crispim, A.P.C(1); Marinho, P.E.S(1); Santos, A.L.H.(1); Oliveira D. B(1,2); Kroon, E.G.(1)

**1** Laboratório de Vírus, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **2** Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, Minas Gerais, Brasil

*Zika virus* (ZIKV) belongs to the family *Flaviviridae*, like *Dengue virus* (DENV) and *Yellow fever virus*(YFV), both classified as arbovirus, being ZIKV transmitted among humans mostly by *Aedes* mosquito species such as *A. aegypti*. ZIKV is a single-stranded, positive sense RNA virus with approximately 11kb genome encoding a single polyprotein which is cleaved in seven non-structural (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) and three structure (C, prM/M, and E) proteins. Recent works have already demonstrated the presence of the virus in urine, serum and semen. The objective of this work was to develop a sensitive and specific PCR assay for the detection of ZIKV. Primers that target the viral envelope region were designed. To measure the sensitivity, urine and serum of healthy individuals were deliberately contaminated with different ZIKV loads and those standards submitted to developed PCR. To test the specificity, PCR was made with genome from other viruses such as *Chikungunya virus* and other flaviviruses. The developed assay was also used to detect ZIKV in specimens from patients who had been positive at qPCR, being four urine and two saliva samples. The semi-nested PCR was shown to be specific for detection of ZIKV. Of the four urine specimens tested all were positive in the developed semi-nested PCR and from the two saliva samples, one was positive. The amplified DNA fragments were sequenced and it was demonstrated that the amplified DNA corresponded to the ZIKV genome. Phylogenetic analyzes show that the sequences clustered with Asian and other circulating samples in Brazil. Non-detection by semi-nested PCR in some positive samples can be explained by the fact that this method amplifies more extensive fragments of the viral genome (342bp). The assay is a good diagnostic tool and can also be of great help in the characterization of ZIKV samples since it targets the gene encoding the viral envelope and provides a fragment with good extension for phylogenetic analysis.

**Key words:** Virus, virology, PCR, Zika virus, Flavivirus, Flaviviridae, detection, diagnostic  
**Financial support:** FAPEMIG, CAPES, CNPq, PrPQ-UFMG



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**RESUMOS**

**Número: 267**

**DETECÇÃO DE *Yellow fever virus* EM PRIMATAS NÃO HUMANOS NO ESTADO DE MINAS GERAIS**

Figueiredo, P.O<sup>1</sup>; Silva, A.T.S<sup>1</sup>; Oliveira, D.B<sup>2</sup>; Oliveira J.S<sup>1</sup>; Amaral C.D; Bonjardim, C.A.<sup>1</sup>; Abrahão, J.S<sup>1</sup>; Drumond B.P<sup>1</sup>; Kroon, E.G.<sup>1</sup>; Trindade, G.S.<sup>1</sup>;

1- Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos, 6627, Campus Pampulha, CEP: 31270-901. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Fax number: +55-31-3443-6482.

2 - Faculdade de Medicina, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri  
Campus JK - Rodovia MGT 367 - KM 583, N° 5000 Diamantina/MG ;CEP 39.100-000

A febre amarela é uma doença infecciosa não contagiosa causada pelo vírus da febre amarela (YFV), um arbovírus do gênero Flavivirus, família *Flaviviridae*. Este vírus é mantido no ciclo silvestre, em que os macacos atuam como amplificadores virais e mosquitos do gênero *Aedes* na África, e *Haemagogus* e *Sabathes* na América, são os vetores. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, atualmente 47 países, 34 da África e 13 da América Central e do Sul são endêmicos ou têm regiões endêmicas para febre amarela. Atualmente, o Brasil vive um dos maiores surtos da sua história. Esses eventos foram inicialmente relatados na região Centro-Oeste, onde o vírus reapareceu em julho de 2014. Posteriormente, a dispersão da transmissão foi observada nas direções sul e sudeste do país, quando afetou o estado de Minas Gerais, com várias epizootias confirmadas. Além disso, 49 municípios de Minas Gerais confirmaram casos da doença. Neste trabalho, foram analisadas amostras de vários órgãos de 2 primatas, da espécie *Callicebus personatus*, que foram encontrados mortos em abril de 2017 na região de Conceição do Mato Dentro. Através da sequenciamento de 202 pb da região NS5, a presença de YFV foi confirmada. A análise filogenética do fragmento sequenciado demonstrou que esta amostra é agrupada junto com o YFV brasileiros.

**Suporte financeiro:** CNPq, PRPq/UFMG



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 268**

### **CARACTERIZAÇÃO DE AVIPOXVIRUS DE DOENÇA GRAVE EM POMBO DOMÉSTICO (*Columba livia*)**

Medeiros, L.B.<sup>1</sup>; Batista, T.G.S.<sup>2</sup>; Sebastiani, M.C.<sup>1</sup>; Mureb, E.N.<sup>1</sup>; Pinto, P.N.<sup>1</sup>; Coelho, H.L.G.<sup>3</sup>; Silva, A.S.G.<sup>2</sup>; Costa C.S.<sup>3</sup>; Marín-Gómez, S.Y.<sup>4</sup>; Martins, N.R.S.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Programa de Residência Integrada em Medicina Veterinária da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais; <sup>2</sup> Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais <sup>3</sup>Graduanda em Medicina Veterinária da Escola de Veterinária da UFMG; <sup>4</sup>Prof. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG.

A varíola ou bouba aviária é causada por diferentes espécies de *Avipoxvirus*, em diferentes grupos de aves, e embora algumas espécies desses vírus pareçam ter maior adaptação a ordens ou famílias, outras apresentam capacidade de infecção mais ampla. Na forma cutânea, a doença tem caráter nodular e proliferativo principalmente na cabeça e região das patas. A forma diftérica resulta em formações pseudomembranosas na mucosa da orofaringe. Relata-se a ocorrência de bouba aviária cutânea generalizada em um pombo doméstico, com a caracterização genética da estirpe de *Avipoxvirus*. Raspados de pele, provenientes de um pombo apresentando lesões cutâneas proliferativas, típicas de bouba, foram encaminhadas para diagnóstico molecular ao setor de doenças das aves. O material foi macerado e tratado com antibiótico e antimicótico, para a inoculação em ovos embrionados (SPF) de 11 dias de idade via membrana cório-alantóide (MCA), para o isolamento do vírus. Lesões características de poxvírus foram visualizadas na MCA e fragmentos foram coletados para extração do DNA total pelo método de sílica. O DNA total foi utilizado como molde para a reação em cadeia de polimerase (PCR) para a amplificação da região que codifica a proteína do cerne viral 4b (*p4b*) (forward: 5'-CAGCAGGTGCTAAACAAACAA-3'; reverse: 5'-CGGTAGCTAACGCCGAATA-3'). Os produtos do PCR foram visualizados em eletroforese e confirmados para o tamanho esperado de 578 pb, e sequenciados pelo método de Sanger. As sequências nucleotídicas foram alinhadas com sequências depositadas no GenBank e as árvores filogenéticas foram construídas por *neighbor-joining*. Encontrou-se uma identidade de 100% com poxvírus isolado de lesões cutâneas de pombos oriundos do Hawaí e Georgia (EUA) nos anos de 1994 e 1995 (acesso GenBank: KC017965 e KC017966). O monitoramento das variações genotípicas dos vírus circulantes poderá ajudar a estabelecer estratégias de prevenção e controle tanto para animais silvestres como domésticos.

**Palavras-chave:** Avipoxvirus, bouba, pombo, seqüenciamento

**Apoio financeiro:** Programa de Residência Integrada em Medicina Veterinária/UFMG/MEC, CNPq, FAPEMIG, CAPES.



**IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia**

**02 e 03 de outubro de 2017**  
**Belo Horizonte - Minas Gerais**

## **RESUMOS**

**Número: 269**

### **IN VITRO CELLULAR INNATE IMMUNE RESPONSE AGAINST *Zika virus***

Natália Lima Pessoa<sup>1,2</sup>, Beatriz Senra A. S. Santos<sup>2</sup>, Thais B. S. Silva<sup>2</sup>, Erna Geessien Kroon<sup>1</sup>, Marco A. Campos<sup>2</sup>

1. Laboratório de Vírus, UFMG
  2. Instituto René Rachou, FIOCRUZ
- E-mail: natalinha\_lima@hotmail.com.

*Zika virus* (ZIKV) is an arbovirus transmitted by mosquitoes of the genus *Aedes*, but vertical and possible sexual transmission are also reported. Phylogenetic analyses of ZIKV reveal the existence of two major lineages: one includes the African isolates, and the other the Asian and American isolates. ZIKV infection was characterized by causing a mild disease presented with fever, headache, rash, arthralgia, and conjunctivitis, with exceptional reports of an association with Guillain-Barré syndrome (GBS) and microcephaly. Our objective was to compare the cellular immune response triggered by two Brazilian isolates of ZIKV (PE243 and SPH). For this, CHO cells transfected with TLR2 or TLR4 were infected with ZIKV and the activation of these TLRs were observed by flow cytometry. Beyond, intraperitoneal macrophages of C57BL/6 mice were infected with ZIKV, and the supernatants from these cells were collected on different days after infection. The supernatants were analyzed by Griess reaction, for the quantification of the nitric oxide produced by the cells and by CBA for the quantification of cytokines. It has been shown that the two ZIKV isolates trigger completely different immune responses. The ZIKV PE243 sample triggered a stronger immune response, with NO production, increased cytokine production and activation of TLR2, whereas the immune response triggered by ZIKV SPH was milder, with no production of NO, lower production of cytokines and without the activation of TLR2.

**Palavras-chave:** Imunidade inata, imunidade celular, ZIKV.

**Financial support:** FIOCRUZ MINAS, CAPES, INCTV, FAPEMIG, PAPES VI-FIOCRUZ, CNPq - MCTIC-CNPq/ MEC-CAPES/ MS-Decit / FNDCT N° 14/2016 – Prevenção e Combate ao vírus Zika.