

LUCIANO LOPES QUEIROZ

BACTERIÓFAGOS EM ALIMENTOS FERMENTADOS: EXEMPLOS DE  
DIVERSIDADE E INTERAÇÕES EM QUEIJO CANASTRA E BOZA

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Microbiologia do Instituto  
de Ciências Biomédicas da Universidade  
de São Paulo, para obtenção do título de  
Doutor em Ciências.

São Paulo  
2021

## **Bacteriófagos em alimentos fermentados: exemplos de diversidade e interações em queijo Canastra e boza**

### **RESUMO**

Bacteriófagos (ou fagos), vírus que infectam bactéria, tem sido descritos em diversos tipos de alimentos fermentados, como vinho, kimchi, kefir, iogurte e queijo. Neste contexto, a diversidade de fagos é melhor caracterizada em ambientes de laticínio, indústria na qual eles podem causar impactos econômicos significativos. Este estudo investigou a comunidade de bacteriófagos em dois alimentos fermentados, queijo Canastra, um queijo artesanal brasileiro, e no Boza, uma bebida fermentada tradicional dos Balcãs. As comunidades microbianas e virais foram acessadas por sequenciamento genômico e metagenômico, técnicas de microbiologia clássica também foram utilizadas para o isolamento e caracterização de bactérias e fagos. Nas amostras de queijo Canastra foi observada uma alta diversidade de fagos, a maioria composta por novas sequências. Genomas bacterianos foram montados a partir do metagenoma dessas amostras e se observou a presença de vários mecanismos de defesa anti-fago, evidenciando as interações entre fagos e bactérias neste ecossistema. Um novo fago lítico capaz de infectar bactérias da espécie *Staphylococcus aureus* foi isolado e caracterizado, e também foi observado o surgimento de uma linhagem bacteriana resistente a infecção durante o ensaio de crescimento entre fago-bactéria. A partir de análises de genômica comparativa entre as bactérias sensíveis e resistentes observou-se mutações em genes associados ao reconhecimento do hospedeiro pelo fagos, evitando que a infecção pelo fago ocorra na linhagem resistente. O microbioma do Boza foi caracterizado, demonstrando uma dominância de espécies de *Leuconostoc*, da qual um genoma foi recuperado, assim como a presença de fagos líticos e lisogênicos no metagenoma. Um fago lisogênico foi detectado e caracterizado no genoma recuperado de *Leuconostoc*. Uma análise filogenômica comparativa com outros fagos integrados em genomas de *Leuconostoc* foi realizada, demonstrando um grande número de fagos lisogênicos neste gênero, assim como a estrutura de seus genomas. Estes resultados abrem novas perspectivas sobre a

composição das comunidade de bacteriófagos e as interações fago-bactéria em alimentos fermentados.

## **Bacteriophage in fermented foods: examples of diversity and interaction in Canastra cheese and boza**

### **ABSTRACT**

Bacteriophages (or phages), viruses that infect bacteria, have been described in several types of fermented foods, such as wine, kimchi, kefir, yogurt, and cheese. In this context, phage diversity is most well characterized in dairy environments, where phages can have significant economic impacts in this industry. This study investigates the bacteriophage community in two fermented foods, Canastra cheese, a Brazilian artisanal cheese, and in Boza, a traditional fermented beverage from the Balkans. Microbial and viral communities were assessed by genome and metagenome sequencing, and classical microbial techniques were also used to isolate and characterize bacteria and phages. A high phage-diversity was observed in Canastra cheese, mostly composed of novel sequences. Bacterial metagenome-assembled genomes (MAGs) were recovered from these samples, encoding several anti-phage defence mechanisms, thus evidencing the interactions between phage and bacteria in this ecosystem. A novel lytic phage able to infect *Staphylococcus aureus* was isolated and characterized, and the emergence of phage resistant bacteria lineage was also observed during the growth dynamics assays between phage and bacteria. Comparative genomic analysis between phage sensitive and phage resistant bacteria showed mutations in genes associated with phage host recognition, preventing phage infection in the mutant bacteria. The Boza microbiome was characterized, showing a dominance of *Leuconostoc* species, from which a Metagenome Assembled Genome (MAG) was obtained, and the presence of lytic and lysogenic phages. A lysogenic phage was detected in this *Leuconostoc* MAG and characterized. A phylogenomic comparative analysis with other phages integrated in *Leuconostoc* genomes was made, demonstrating a high number of lysogenic phages in this genus, as well as their genome structures. These results shed lights into the bacteriophage community composition and the phage-bacteria interactions in fermented foods.