

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – UNISO

***TRABALHO COMPLETO CONTENDO ARTIGOS CIENTÍFICOS. AGUARDANDO A PUBLICAÇÃO DOS RESULTADOS**

RESUMO

A mancha aureolada do cafeeiro é causada pela bactéria *Pseudomonas coronafaciens* pv. *garcae* (Pcg). A doença persiste como um desafio para a cafeicultura brasileira, ocasionando perdas econômicas que impactam o comércio do café. Este trabalho de pesquisa teve como objetivo isolar bacteriófagos estritamente líticos para Pcg, visando o desenvolvimento de nanopartículas líticas integrando tais fagos para o controle dessa bacteriose. Os dois fagos isolados foram analisados quanto às suas características físico-químicas através de varredura espectral UV-Vis, determinação do coeficiente de extinção molar, microscopia eletrônica de transmissão (MET) e espalhamento dinâmico de luz-laser (DLS). A caracterização biológica incluiu a determinação das curvas de um só ciclo síncrono de crescimento (OSGC) das partículas fágicas no hospedeiro bacteriano para determinação dos parâmetros de crescimento, das curvas de adsorção das partículas fágicas ao hospedeiro bacteriano para determinação das taxas de adsorção e dessorção, curvas de inativação bacteriana in vivo e ex vivo a diferentes valores de multiplicidade de infecção (MOI), determinação da taxa de emergência de mutantes bacterianos resistentes aos fagos isolados, determinação das gamas de hospedeiros e da eficiência de plaqueamento (EOP), e análises genômicas detalhadas dos DNAs fágicos. Também foram realizados experimentos de infecção artificial de mudas de cafeeiros em casa de vegetação, para avaliar a eficácia das nanopartículas líticas desenvolvidas, além de ensaios para avaliar a influência de fatores abióticos (pH, T e radiação solar) sobre a atividade lítica dos fagos isolados, e avaliação do potencial impacto dos fagos na microbiota das abelhas. A análise genômica confirmou suas classificações taxonômicas específicas, com o fago PcgM02F como vírus > Duplodnaviria > Heunggongvirae > Uroviricota > Caudoviricetes > Straboviridae > Tevenvirinae > Tequatrovírus, e o fago PcgM04F como vírus > Duplodnaviria > Heunggongvirae > Uroviricota > Caudoviricetes > Stephanstirmvirinae > Phapecoctavirus. Experimentos de inativação

bacteriana in vitro demonstraram que os fagos, individualmente, foram eficazes na redução da população de células bacterianas de Pcg, com os melhores resultados a serem alcançados com um MOI de 10, enquanto que o coquetel fágico integrando os dois fagos permitiu uma redução eficaz da carga bacteriana com um MOI de 0,1. Nos ensaios de inativação bacteriana ex vivo, foi necessário aumentar o MOI para 100 para se conseguir uma maior redução da população bacteriana em folhas de cafeeiro; isto pode ter-se devido a uma provável redução da mobilidade das partículas fágicas na matriz sólida das folhas de cafeeiro com efeitos nefastos importantes no encontro com células bacterianas e consequente adsorção nas mesmas, condição sine qua non para o processo de infecção fágica. A influência dos fatores abióticos sobre os dois fagos revelou que os mesmos são sensíveis a condições adversas como valores de pH 5,0 e 10,0, a temperaturas elevadas (41 °C) e à radiação solar. Em mudas de cafeeiro infectadas artificialmente com Pcg, aplicações com as nanopartículas líticas foram mais eficazes do que aplicando os fagos livres, ao longo de 28 dias de ensaio. Os estudos realizados não mostraram alterações significativas na microbiota nativa total das abelhas testadas após exposição ao coquetel de fagos. Este trabalho de pesquisa promissor ressaltou a segurança dos fagos como agentes de biocontrole da Pcg, indicando um caminho viável para a adoção desta tecnologia verde. Isso poderá contribuir para um crescimento sustentável no mercado globalizado, onde a busca por métodos de produção agrícola mais seguros e ecológicos é crescente.

Palavras-chave: bacteriófagos; cafeeiro; mancha aureolada; *Pseudomonas coronafaciens* pv. *garcae*; biocontrole; fitopatógeno.

ABSTRACT

Coffee halo spot is caused by the bacterium *Pseudomonas coronafaciens* pv. *garcae* (Pcg). The disease persists as a challenge for Brazilian coffee production, causing economic losses that impact the coffee trade. This research work aimed to isolate bacteriophages strictly lytic for Pcg, aiming at the development of lytic nanoparticles integrating such bacteriophages for the control of this bacteriosis. The two isolated phages were analyzed for their physicochemical characteristics by UV-Vis spectral scannings, determination of the molar extinction coefficient, transmission electron microscopy (TEM) and dynamic laser light scattering (DLS). The biological characterization included the determination of single synchronous growth cycle (OSGC) curves of the phage particles in the bacterial host to determine the growth parameters, the adsorption curves of the phage particles to the bacterial host to determine the adsorption and desorption rates, in vivo and ex vivo bacterial inactivation curves at different multiplicity of infection (MOI) values, determination of the emergence rate of bacterial mutants resistant to the isolated phages, determination of the host ranges and plating efficiency (EOP), and detailed genomic analyses of the bacteriophage DNAs. Artificial infection experiments of coffee seedlings were also carried out in greenhouse conditions to evaluate the efficacy of the developed lytic nanoparticles, in addition to tests to evaluate the influence of abiotic factors (pH, T and solar radiation) on the lytic activity of the isolated bacteriophages, and evaluation of the potential impact of the phages on the microbiota of bees. Genomic analysis confirmed their specific taxonomic classifications, with phage PcgM02F as virus > Duplodnaviria > Heunggongvirae > Uroviricota > Caudoviricetes > Straboviridae > Tevenvirinae > Tequatrovirus, and phage PcgM04F as virus > Duplodnaviria > Heunggongvirae > Uroviricota > Caudoviricetes > Stephanstirmvirinae > Phaecocotavirus. In vitro bacterial inactivation experiments demonstrated that the two phages, individually, were effective in reducing the population of Pcg bacterial cells, with the best results being achieved at a MOI of 10, while the phage cocktail integrating the two bacteriophages allowed an effective reduction of the bacterial load at a MOI of 0.1. In the ex vivo bacterial inactivation tests, it was necessary to increase the MOI to 100 to achieve a greater reduction in the bacterial population on coffee leaves; this may have been due to a probable reduction in the mobility of the phage particles in the solid matrix of the coffee leaves, with significant deleterious

effects on the encounter with bacterial cells and consequent adsorption on them, a sine qua non condition for the phage infection process. The influence of abiotic factors on the two phages revealed that they are sensitive to adverse conditions such as pH values of 5.0 and 10.0, high temperatures (41 °C) and solar radiation. In coffee seedlings artificially infected with Pcg, applications with lytic nanoparticles were more effective than applying the free phages over 28-day trials. The studies performed did not show significant changes in the total native microbiota of the tested bees after exposure to the two bacteriophages. This promising research work highlighted the safety of bacteriophages as biocontrol agents for Pcg, indicating a viable path for the adoption of this green technology. This could contribute to a sustainable growth in a globalized market, where the search for safer and more environmentally friendly agricultural production methods is increasing.

Keywords: bacteriophages; coffee plant; halo spot; *Pseudomonas coronafaciens* pv. *garcae*; biocontrol; phytopathogen.