



Isolamento de um bacteriófago polivalente de *Escherichia coli* para controle em cama de aviário
Isolation of a polyvalent *Escherichia coli* bacteriophage for control in poultry farm

Guilherme Roberto Nedochetko ¹, Allan Moreira Terrabuio ², Alice Chiapetti Bolsan ³, Gabrielli Vaz Sampaio ⁴, Andressa Tonin ⁵, Naiana Cristine Gabiatti ⁶

RESUMO

A *Escherichia coli* é uma bactéria que está presente em todo o mundo, ela é a causadora de infecções intestinais que acometem humanos e animais. Em função de sua alta adaptabilidade e potencial de dispersão, também gera vários problemas no setor agroindustrial, em especial, na atividade avícola. Essa bactéria ocasiona diversas enfermidades leves e graves nas aves, gerando perdas econômicas para os produtores, além de todos os riscos de contaminação em humanos. A abordagem padrão para se tratar infecções bacterianas atualmente é o uso de antibióticos, porém, o surgimento e dispersão de bactérias multirresistentes tem se acentuado. A *E. coli*, inclusive, já possui diversas cepas resistentes passíveis de gerar uma crise na saúde mundial. Portanto, mais do que nunca, um tratamento alternativo para bactérias deve ser desenvolvido, sendo que uma possível forma seria o uso de bacteriófagos, vírus que conseguem infectar bactérias e causar sua lise. Este trabalho teve o objetivo de isolar um fago polivalente que consegue infectar duas cepas de *E.coli*, purificá-lo e concentrá-lo para formar um estoque pronto para ser utilizado em diversos testes, mostrando que ele possui uma polivalência entre as duas cepas e pode ser uma nova técnica de controle bacteriano.

PALAVRAS-CHAVE: Avicultura; resistência a antibiótico; Fagos;

ABSTRACT

Escherichia coli is a bacterium that is present throughout the world. It is the cause of an intestinal infection that infects humans and animals. Due to its high adaptability and dispersion potential, it also generating several problems at the agro-industrial sector, especially in poultry farming. This bacterium causes several mild and serious illnesses in birds that can generate economic losses for those who produce them, in addition to all the risks of contamination in humans. The standard way to treat bacterial infections currently is the use of antibiotics, however, increasingly bacteria that are multi-resistant to antibiotics are being accentuated. *E. coli* is a bacterium that already has several multi-resistant strains that may in the near future generate a global health crisis. Therefore, more than ever an alternative treatment for bacteria must be developed, one possible way would be the use of bacteriophages, viruses that can infect bacteria and cause their lysis. This work aimed to isolate a respective phage of two *E. coli* strains purify and concentrate it to form a stock ready to be used in various tests, showing that this phage is polyvalent between the two strains and can be a new bacterial control technique.

KEYWORDS: Poultry Farming; Antibiotic resistance; Phages.

¹ Bolsista da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil. guilhermenedochetko@alunos.utfpr.edu.br ID Lattes: 6553146751162310.

² Bolsista da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil. Terrabuio@alunos.utfpr.edu.br ID Lattes: 4064887531133737.

³ Bolsista da CAPES. Programa de Pós Graduação em Sustentabilidade Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba Paraná, Brasil. alice1bolsan@gmail.com. ID Lattes: 9517183930139007.

⁴ Bolsista Capes, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP Brasil. gabriellisampaio@icb.usp.br ID Lattes: 4884964506790389.

⁵ Bolsista da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil. andressatonin@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 3497550339459459.

⁶ Docente no Curso de Engenharia de Bioprocessos E Biotecnologia e Programa de Pós Graduação em Biotecnologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil naianagabiatti@utfpr.edu.br ID Lattes: 2104316393734002.



INTRODUÇÃO

A *Escherichia coli* é uma bactéria gram-negativa que faz parte do grupo dos coliformes. Na avicultura, essa bactéria é responsável por infecções intestinais nas aves, gerando diversos problemas para o produtor. No Brasil, são produzidas cerca de 14 milhões de toneladas de carne de frango por ano, sendo o país o segundo maior produtor neste ramo no mundo (ABPA, 2023). Porém, nesse mercado sempre há infecções causadas pela dispersão de bactérias no ambiente, incluindo a *E.coli*. O uso desenfreado de antibióticos para o tratamento deste problema pode ocasionar a seleção de bactérias multirresistentes e, conseqüentemente, a perda de produção e prejuízo (FERREIRA, 2022). Por isso, faz-se necessário o desenvolvimento de uma outra forma de tratamento de bactérias quando o antibiótico não apresentar um resultado satisfatório.

Um método alternativo de controle bacteriano são os bacteriófagos, vírus que possuem a capacidade de infectar uma bactéria e causar sua lise (ROSSI, et al, 2010). Além disso, os fagos possuem uma seletividade de escolha do seu hospedeiro, e, ao contrário do antibiótico, que elimina todos os tipos de bactérias, o fago não possui muitos hospedeiros, geralmente apenas um, porém, em alguns casos podem ser relatados os fagos polivalentes que possuem mais de um hospedeiro (GABIATTI, 2018). Os fagos são os vírus mais abundantes do planeta, sendo que há uma estimativa de que existem aproximadamente dez vezes mais partículas de bacteriófagos do que de bactérias (MANN, 2005). Sendo assim, o uso dos fagos para controlar o crescimento bacteriano em diversos ambientes, incluindo a cama de aviário, mostra-se ser uma técnica interessante.

Esse método já foi estudado e reproduzido em laboratório para o controle de crescimento da *Escherichia coli*, como reportado por TANJI, Y. et al. (2005). De maneira análoga a isto, esse trabalho possui o objetivo de isolar um bacteriófago a partir de uma amostra coletada em um rio urbano, realizar o processo de concentração para se obter um estoque de fagos, testar sua efetividade no controle de crescimento de duas cepas de *E.coli*, mostrando sua polivalência, que é muito importante para uma futura aplicação da técnica de fagoterapia em ambientes da avicultura, comparando-a com a abordagem padrão (uso de antibióticos), comprovando uma semelhança entre os dois métodos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioprocessos (LAPRO), Laboratório de Biotecnologia Ambiental e Alimentos (LABIA) e o Laboratório de Microbiologia (BIOMOL) da UTFPR, Campus Dois Vizinhos.

As duas cepas de *E. coli* (EC1 e EC2) foram provenientes do LAPRO, elas passaram por um teste de antibiograma, que consiste em colocar alguns discos de antibióticos em contato com a bactéria para observar sua eficiência em combatê-la. Para esta *E. coli* foram usados os seguintes antibióticos: ciprofloxacina, gentamicina, amoxicilina e ampicilina.

O processo de isolamento de um bacteriófago dessas bactérias foi feito a partir da adição de 50mL de uma amostra ambiental proveniente de um rio urbano da cidade de Dois Vizinhos, 50mL de caldo nutriente e 3mL de de cultura líquida da EC1 e 3mL da



cultura líquida da EC2. Esta mistura foi incubada em um shaker por 24h, á 37°C e 160 rpm, este processo é chamado de enriquecimento líquido.

Após esse tempo, foi realizada a centrifugação da amostra enriquecida a 8000 rpm por 8 min, o sobrenadante foi coletado e o teste da placa de lise foi feito aplicando a técnica da dupla camada de ágar (ADAMS et al. 1959). Para isto, é necessário adicionar 100uL da cultura líquida de *E. coli* e 500uL da amostra enriquecida no soft ágar (10g L⁻¹ de Tryptona, 9g L⁻¹ de ágar-ágar e 5g L⁻¹ de KCl) em uma temperatura de aproximadamente 45°C para ele não solidificar antes da hora, o teste foi realizado separadamente para cada cepa de *E.coli*. Então, é vertida essa mistura em cima de uma placa de ágar PCA (Plate Count Agar) e colocado numa estufa a 37°C por no máximo 24 horas. Este processo faz com que formem placas de lises bacterianas provocadas pelos fagos no ágar.

Após a realização deste procedimento, as placas de lises que surgiram foram coletadas com auxílio de uma micropipeta e suspensas em tampão SMB (5,2g L⁻¹ de NaCl, 2g L⁻¹ de sulfato de magnésio, 6,35g L⁻¹ de Tris-HCl e 0,01% de solução de gelatina, com pH ajustado para 7,5), as placas de lises devem ser suspensas separadamente no SMB (triplicata) e agitadas em um vortex por 10 min, após isso, foi realizado a centrifugação a 8000rpm por 8 min. O sobrenadante é retirado, este é o estoque heterogêneo de fagos.

Foi feita então a diluição desse estoque até 10⁻⁴ (varia de fago para fago) e plaqueado 100uL da diluição com 100uL da cultura líquida de *E.coli* seguindo os passos da técnica da dupla camada de ágar (ADAMS et al. 1959). Ademais, foi feito o *Drop Spot Test*, que consiste em pingar 10uL do estoque heterogêneo de fago numa placa de dupla camada de ágar soft que contém apenas a 100uL da cultura líquida de *E. coli* (GABIATTI,2018). Esses dois testes serviram para confirmar que o procedimento funcionou e também observar a eficiência do bacteriófago em contato com a bactéria. Os dois testes foram realizados com as duas cepas de *E.coli* separadamente, a EC2 se mostrou mais eficiente, por isso, a continuidade do processo foi feita apenas com ela.

O processo de purificação do bacteriófago foi feito realizando a coleta de um halo de lise da placa da diluição e plaqueando seguindo as instruções do teste da dupla camada de ágar. Cada vez que é feito isto, apenas uma placa de lise é selecionada. O processo foi repetido três vezes, garantindo no final um fago purificado, como descreve em SAMBROOK et al (1989). Em todas as fases da purificação foi realizado *Drop Spot Test* para escolher o fago que foi mais eficiente.

Agora que o fago já estava purificado, foi feito o processo de concentração do fago para obter um estoque concentrado, para isso, foi colocado cerca de 500uL da cultura líquida da *E. coli* em 50mL de de caldo nutriente, deixado na estufa por cerca de 5 horas a 37°C (tempo que a bactéria está na fase exponencial), após este tempo, adicionado 500uL do estoque de fago purificado e deixado no shaker aproximadamente por 15 horas, 160rpm e 37°C. Foi adicionado 5% de clorofórmio e centrifugado a 8000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi coletado. Após isso, adicionado NaCl (29,2g/500mL) na mistura e após diluir bem, foi deixado na geladeira por 1 hora, depois adicionado o PEG (Polietilenoglicol) e deixado na geladeira até o dia seguinte. O tubo foi levado para uma centrifugação á 4°C, 14000 rpm por 20 minutos, o sobrenadante foi retirado e o precipitado foi ressuscitado no tampão SMB (5,2g L⁻¹ de NaCl, 2g L⁻¹ de sulfato de magnésio, 6,35g L⁻¹ de Tris-HCl e 0,01% de solução de gelatina, com pH ajustado para 7,5), produzindo agora um estoque concentrado de fagos purificados.

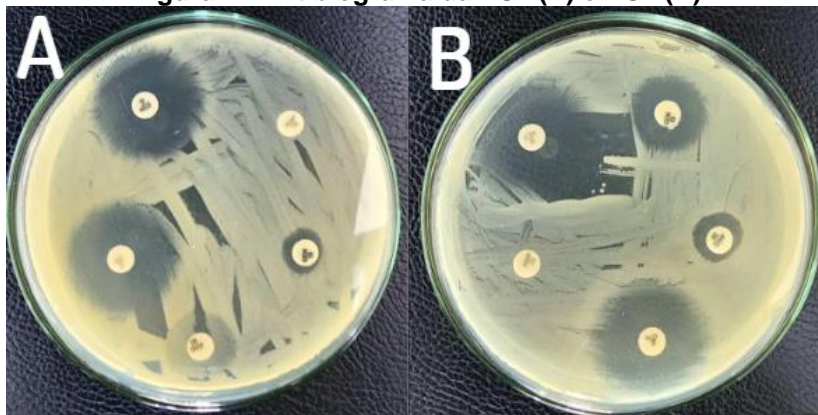


Por fim, foi realizado um *Drop Spot Test* do estoque na EC1 para observar se este fago é polivalente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O antibiograma feito nas duas *E. coli* estão representados na figura 1. O tamanho do raio dos halos ocasionados por cada antibiótico na EC1 e EC2, respectivamente, foram: Ciprofloxacina com 2,9 cm e 2,5 cm, Gentamicina com 1 cm e 1,9 cm, amoxicilina com 1,6 cm e 1,2 cm e por fim a ampicilina que não formou halo. Com isso, fica evidente que ambas as cepas de *E. coli* possuem resistência total à ampicilina e parcialmente à amoxicilina. Dessa forma, esses antibióticos podem acabar sendo usados para o tratamento de uma infecção causada por essa bactéria e não irão funcionar adequadamente.

Figura 1 - Antibiograma da EC1 (A) e EC2 (B)



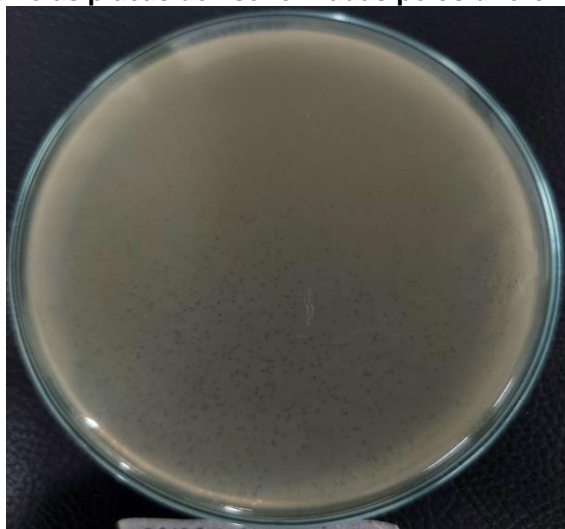
Fonte: Autoria própria (2023)

Ao realizar o enriquecimento líquido do fago com a bactéria, foi possível observar várias pequenas placas de lises transparentes na dupla camada de ágar (figura 2). Este é um indicativo da presença de bacteriófagos de ciclo lítico, que são mais virulentos (JURCZAK-KUREK et al., 2016). Com esses resultados, pode-se afirmar que existe *E. coli* no rio urbano onde foi coletada a amostra para isolar o fago, porque onde tem o fago, consequentemente tem seu hospedeiro também, como mencionado por ALHARBI; ZIADI (2021) em seu trabalho. Este dado é preocupante, pois a *E. coli* é um ser vivo que está presente no trato intestinal de humanos e animais, então, muito provavelmente está ocorrendo um descarte inapropriado do esgoto naquele rio.

Uma característica comum dos fagos da *Escherichia coli* são as placas de lises serem muito pequenas, em alguns casos, a observação tem que ser feita com o auxílio de uma lupa. Para este fago não é necessário, porém, ao comparar com placas de lises feitas por outros fagos que infectam bactérias diferentes da *E. coli*, a diferença de tamanho e visibilidade é alta. Esse fenômeno que já foi relatado por LOS et al (2008) pode dificultar no isolamento de fagos de *E. coli*, pois se não houver o conhecimento dessa característica, a placa de lise pode acabar sendo confundida com apenas alguma imperfeição no ágar.



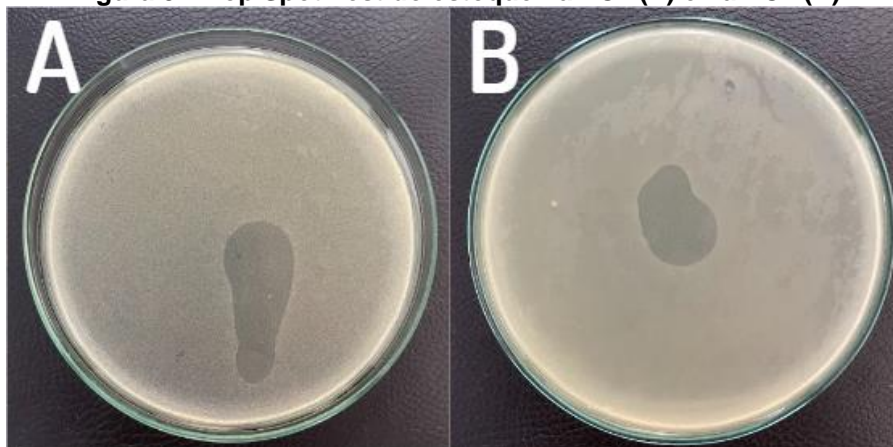
Figura 2 - Placa com a EC2 e as placas de lise formadas pelos diferentes fagos que a infectaram



Fonte: Autoria própria (2023)

No fim do processo de concentração, foi realizado o *Drop Spot Test* do estoque de fagos na EC1 e na EC2 (Figura 3), sendo possível observar claramente que o fago possui uma boa efetividade em controlar o crescimento de ambas as cepas de *E. coli*. Também é notável a diferença da coloração de onde não tem o fago e de onde foi colocado 10uL do estoque de fagos. A formação de um círculo transparente mostra que o fago inibiu totalmente a proliferação da bactéria no local onde ele estava. Esse comportamento já foi observado em fagos por GABIATTI (2018), sendo que esse tipo de bacteriófago possui uma polivalência, ou seja, tem mais de um hospedeiro. Portanto, esse comportamento é bem interessante para uma possível aplicação da fagoterapia em diversos ambientes, como o setor avícola.

Figura 3: Drop Spot Test do estoque na EC1 (A) e na EC2 (B)



Fonte: Autoria própria (2023)

CONCLUSÃO

Diante dos fatos apresentados, conclui-se que o fago isolado é polivalente e tem potencial para ser usado no controle do crescimento de, pelo menos, duas cepas de *E. coli*, que já apresentam certa resistência a antibióticos. Com o estoque concentrado de



XIII Seminário de Extensão e Inovação

XXVIII Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica da UTFPR

Ciência e Tecnologia na era da Inteligência Artificial: Desdobramentos no Ensino Pesquisa e Extensão
20 a 23 de novembro de 2023 - Campus Ponta Grossa, PR

SEI-SICITE
2023



fagos, mais testes poderão ser realizados para desenvolver melhor a técnica da fagoterapia em ambientes de avicultura.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos, e, além disso os autores agradecem ao Laboratório de Biotecnologia Ambiental e Alimentos (LABIA), Laboratório de Bioprocessos (LAPRO) e Laboratório de Microbiologia (BIOMOL).

CONFLITO DE INTERESSE

Não há conflito de interesse

REFERÊNCIAS

- ALHARBI, N. M.; ZIADI, M. M. Wastewater as a fertility source for novel bacteriophages against multi-drug resistant bacteria. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [S. l.], v. 28, n. 8, p. 4358–4364, 2021.
- Biodiversity of bacteriophages: morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage. **Scientific Reports** [S. l.], v. 6, 2016.
- Central de Inteligência de Aves e Suínos. **EMBRAPA**, 2023. Disponível em: <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas><https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas>. Acesso em: 11, set, 2023.
- FERREIRA, M. S. R. Perfis de resistência a antibióticos em isolados de Escherichia coli de frangos do campo e de avicultura industrial. 2022. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10174/31352>.
- GABIATTI, N. C. Isolamento, caracterização e incorporação de fagos polivalentes em esporos bacterianos para uso em controle biológico. 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/194381>.
- LOS, J. M et al. "Simple method for plating Escherichia coli bacteriophages forming very small plaques or no plaques under standard conditions." **Applied and environmental microbiology**, [S.I] vol. 74,16 (2008).
- MANN, N. H. The Third Age of Phage. **PLoS Biology**, [S. l.], v. 3, n. 5, p. e182, 2005. Acesso em: 11, set, 2023.
- ROSSI, L. P. R.; ALMEIDA, R. C. de C. Bacteriófagos para controle de bactérias patogênicas em alimentos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, [S. l.], v. 69, n. 2, p. 151–156, 2010. Disponível em: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/RIAL/article/view/32649>. Acesso em: 11 set. 2023.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**, v. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1989. Acesso em: 10, set, 2023.
- TANJI, Y; SHIMADA, T; FUKUDOMI, H; MIYANAGA, K; NAKAI, Y; UNNO, H; Therapeutic use of phage cocktail for controlling Escherichia coli O157:H7 in gastrointestinal tract of mice. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s.i], v. 100, p. 280-287, 2005. Acesso em: 11, set, 2023.