

Caracterização de bacteriófago para utilização no controle de crescimento de *Salmonella* em cama de aviário

Characterization of Bacteriophage for use in controlling *Salmonella* growth in poultry litter

Allan Moreira Terrabuio¹, Gabrielli Vaz Sampaio², Alice Chiapetti Bolsan³, Naiana Cristine Gabiatti⁴

RESUMO

A *Salmonella* é uma bactéria em forma de bacilo, gram-negativa, que vem causando inúmeras perdas no setor aviário. O Brasil, um dos três principais produtores, exportadores e consumidores de frango do mundo, vem sendo afetado devido a diminuição na eficácia de tratamento contra *Salmonella*, que adquiriu resistente a antibióticos devido ao seu uso indiscriminado. Neste sentido, há urgência no desenvolvimento de métodos alternativos para o controle de crescimento bacteriano e um deles é a utilização de bacteriófagos, vírus capazes de infectar bactérias que, quando seguem o ciclo lítico, são capazes de causar sua lise, tornando esses vírus uma alternativa para combater bactérias com multirresistência a antibióticos. Sendo assim o vigente trabalho teve como foco caracterizar um fago, realizando ensaio de inibição em cultura líquida que apresentou a capacidade do fago como agente inibitório da *Salmonella* e por meio de um ensaio térmico de 35°C até 60°C, comprovou-se sua estabilidade nessa faixa térmica, tornando esse fago um foco promissor para estudos futuros, a fim de testar sua resistência frente a outros fatores ambientais e possíveis aplicações.

PALAVRAS-CHAVE: Bacteriófago; Caracterização; *Salmonella*.

ABSTRACT

Salmonella is a gram-negative, bacillus-shaped bacterium that has been causing numerous losses in the poultry sector. Brazil, one of the three main producers, exporters and consumers of chicken in the world, has been affected due to a decrease in the effectiveness of treatment against *Salmonella*, which has become resistant to antibiotics due to its indiscriminate use. In this sense, there is an urgency to develop alternative methods for controlling bacterial growth and one of them is the use of bacteriophages, viruses capable of infecting bacteria that, when following the lytic cycle, can cause their lysis, making these viruses an alternative to combat bacteria with multi-resistance to antibiotics. Therefore, the current work focused on characterizing a phage, carrying out an inhibition test in liquid culture that showed the phage's capacity as an inhibitory agent for *Salmonella* and through a thermal test from 35°C to 60°C, its stability in this thermal range was proven, making this phage a promising focus for future studies, to test its resistance to other environmental factors and possible applications.

KEYWORDS: Bacteriophages; Characterizing; *Salmonella*.

¹Bolsista da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil. Terrabuio@alunos.utfpr.edu.br ID Lattes: 4064887531133737.

²Bolsista da CAPES. Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo Brasil. gabriellisampaio@icb.usp.br. ID Lattes: 4884964506790389.

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

⁴Docente 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 indústria alimentícia gera muita renda e é o setor que o Brasil se destaca em escala global como o maior produtor, exportador e consumidor de produtos de origem animal (HOTZEL MARIA JOSE E VANDRESEN, BIANCA, 2022). No setor avícola, o Brasil exporta cerca de 14.500 mil toneladas anuais, ficando entre os três principais países exportadores de frango de corte no mundo de acordo com a Embrapa Suínos e Aves, (2021).

Na exportação de carnes, especialmente de frango, as bactérias tornaram-se uma problemática, especialmente a *Salmonella*, que devido ao uso indiscriminado de antibióticos ocasionou o aumento de cepas isoladas que possuem multirresistência a antibióticos, gerando preocupação mundial, já que os tratamentos vêm tonando-se limitados (TACCONELLI et al., 2018), além disso o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA-ERS), relatou em 2007, 1,4 milhões de casos de Salmonelose que ocasionou uma perda econômica estimada em U\$ 2.4 milhões.

Uma alternativa para combater bactérias são os bacteriófagos (fagos), que possuem alta especificidade comparado aos antibióticos e podem possuir uma excelente resistência a diversos fatores ambientais. Esses vírus quando seguem o ciclo lítico infectam bactérias para usar o seu maquinário metabólico para se replicar e posteriormente causar sua lise. Sua aplicação para inibição de *Salmonella* já foi reportada como eficiente quando aplicado em derivados do frango (GUENTHER et al., 2012; JIANXIONG et al., 2010). Demonstrando a possibilidade de aplicação desses vírus em estratégias de controle de crescimento de *Salmonella*.

Para garantir uma aplicação de bacteriófagos eficaz, a caracterização do vírus isolado é um ponto crucial para poder analisar sua viabilidade de aplicação. Testes de temperatura, por exemplo, que apresentam o comportamento do vírus em diferentes níveis térmicos, que no caso da *Salmonella*, torna-se interessante pois, a cama de aviário fica em torno de 32°C e métodos de sanitização como fermentação térmica chegam a 43°C (FLORES et al., 2010).

Outro aspecto que a caracterização traz é análise de inibição em cultura líquida, a qual fornece como resultado a capacidade que o fago possui em inibir o crescimento da cepa testada em diferentes MOIs (proporção entre fagos e bactérias), gerando dados da eficácia como agente de controle biológico, sendo esse um teste já reportado por (ZHANG et al., 2023). Sendo assim vigente trabalho teve como objetivo estudar a capacidade de um fago de causar inibição de crescimento da *Salmonella* em cultura líquida e averiguar sua resistência térmica, a fim de obter dados que possam ser usados em futuras aplicações.

Materiais e Métodos

Utilizando um fago isolado a partir da rede esgoto (SAMPAIO, G. V et al., 2022), que foi previamente purificado e concentrado, os experimentos foram realizados no LABCa e LAPRO (Laboratório de Bioprocessos). O teste de inibição em cultura líquida foi realizado em placa de 96 poços onde foi monitorada a densidade óptica (OD600). Na placa foram testados em triplicata os MOIs de 0,1; 1; 10 e 100, além do controle contendo apenas a



cepa bacteriana. A cultura líquida de *Salmonella* foi utilizada em fase exponencial, numa concentração aproximada de 10^8 UFC/ml. O equipamento leitor de placas Victor Nivo™ (PerkinElmer) foi configurado com os seguintes parâmetros: 600nm, 37°C, 20 horas de processo, com agitação de 2s antes das leituras, as quais serão realizadas a cada 30 min desde o tempo zero.

Na placa de 96 poços foram depositados 140µL de caldo nutriente, 100µL de cultura bacteriana e 10µL de estoque de fagos, para os testes dos MOIs e para o controle, foi utilizado 140µL de caldo nutriente, 10µL de SMB e 100µL de cultura líquida bacteriana e no branco foi utilizado somente 250µL de caldo nutritivo.

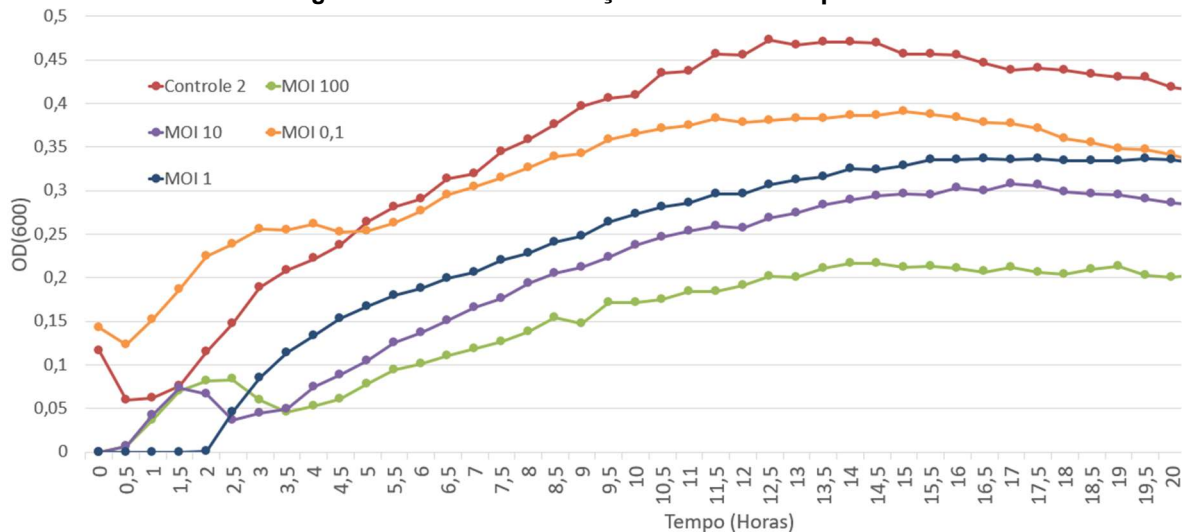
Para o ensaio de temperatura foram preparados 2 tubos Falcon de 15ml contendo 10ml de SMB, em seguida esses foram deixados no banho maria na temperatura de teste por 5min, em sequência adiciona-se o estoque de fagos para que a concentração no tubo fique 10^7 PFU/ML. Assim que o fago é adicionado e homogeneizado, coleta-se uma alíquota de 200µL de cada tubo, que são denominados 1T0 e 2T0 em paralelo o tempo é iniciado, o ensaio ocorre durante 60min e as coletas são realizadas a cada 15min, e os tubos são deixados em gelo brita durante o processo.

Posterior as coletas são feitas diluições até 10^{-6} e cada ponto é plaqueado utilizando o ensaio dupla camada de ágar (ADAMS et al. 1959). Que consiste na utilização de 5mL de soft ágar (10 g L⁻¹ de Tryptona, 9 g L⁻¹ de ágar, ágar e 5 g L⁻² 1 de KCl) a 45 °C, nesse é adicionado 100µL de cultura líquida da Salmonella e 100µL da amostra e em sequência o conjunto é vertido sobre a primeira camada de ágar constituída por PCA (Plate Count Agar) e deixada em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 h, para averiguar a presença de placas de lise o processo é feito para cada ponto. O teste foi realizado com temperaturas de 35° até 60°.

Resultados e discussão

O ensaio de inibição em cultura líquida, apresenta os resultados comparando o crescimento bacteriano puro (“controle”), com soluções que possuem fagos, no qual são aplicados os MOIs, eles representam a relação proporcional entre a concentração de fagos e de bactéria, o MOI 1 tem a concentração de fagos para bactérias igual, já um MOI de 10, tem dez vezes mais fagos que a concentração de bactérias, dessa forma o teste realizado aplicou MOIs de 0,1; 1; 10 e 100, que forma analisado durante 20 horas dando como resultado o gráfico abaixo:

Figura 1 – Ensaio de Inibição em cultura líquida.



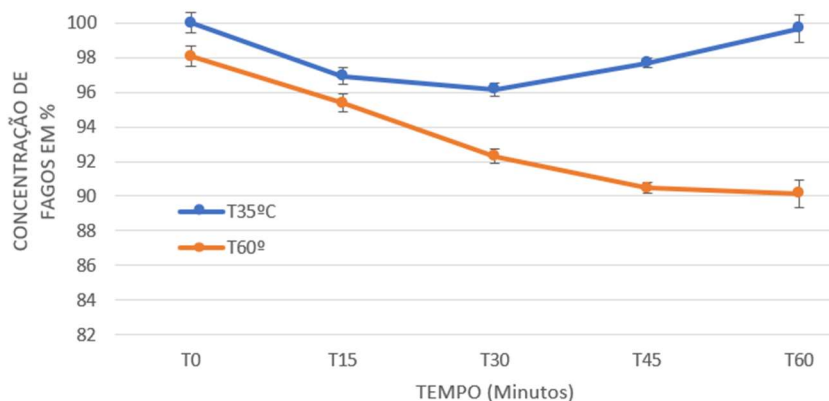
Fonte: Autoria própria (2023).

Com base na figura 1 é possível averiguar que, ao comparar os MOIs testados, o fago foi capaz de inibir o crescimento da *Salmonella* e que quanto maior o MOI, melhor é o controle do crescimento, apresentando assim o fago como um promissor agente de controle.

Alguns trabalhos, já reportaram a eficácia dos bacteriófagos no controle de crescimento da *Salmonella*, como o reportado por (ZHANG et al., 2023), que apresentou um controle similar ao desse trabalho, o autor reportou o controle realizado pelo fago por um período de 20 horas, sendo esse o mesmo tempo aplicado nesse trabalho e o fago se mostrou ativo e eficaz durante esse período.

Como segundo resultado, temos o teste de temperatura que tem como objetivo medir a estabilidade do bacteriófago ao longo do tempo de 60min sobre condições adversas de temperatura, no caso desse teste foram aplicadas temperaturas de 35°C até 60°C, e foram plotados em conjunto no gráfico abaixo as duas temperaturas citadas:

Figura 2 – Gráfico do ensaio de Teste de temperatura



Fonte: Autoria própria (2023).



Como base nos dados plotados, vemos que o fago possui uma boa estabilidade com relação a temperatura, tendo uma perda sutil de aproximadamente 10% em sua concentração ao comparar 35°C com 60°C, o que torna esse vírus aplicável nessas temperaturas.

Tomando como base alguns métodos de tratamento da cama de aviário, o método de fermentação, que visa aplicar altas temperaturas sobre a cama para que haja a inibição de crescimento de bactérias patogênicas, consegue atingir temperaturas de até 43°C e há dificuldade em manter esse valor ou atingir uma temperatura próxima dos 60°C, sendo 57,2°C a temperatura comum de morte térmica da *Salmonella* (FLORES et al., 2010). Além disso a temperatura em uma cama de aviário varia de 27°C até 32° quando há presença de frangos. Com base nisso vemos que nas temperaturas citadas e com base nos testes o fago suportaria essas variações.

Com base nesses dados obtidos do ensaio térmico, vemos que se o fago fosse aplicado em cama de aviário durante seu uso ou durante o processo de fermentação poderia resistir as temperaturas que são atingidas e que ao comparar esse fator aos dados obtidos do ensaio de inibição em cultura líquida o fago seria um promissor agente de controle de *Salmonella*.

Conclusão:

Com base nos dados obtidos do leitor de microplacas e do teste de temperatura o fago testado pode ser usado como agente de controle de *Salmonella*, tanto em cama de aviário durante o processo de fermentação, tendo em vista sua estabilidade até 60° e junto a isso ensaio de inibição comprovou sua capacidade de controlar o crescimento dessa bactéria. Sendo assim o fago é um promissor foco de estudos para analisar em trabalhos futuros sua possível aplicação, além disso sua estabilidade frente a outros fatores ambientais.

Agradecimentos

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

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

Referências

ADAMS M. H. Bacteriophages. Interscience Publishers, **New York**, 624p, 1959.



Ahiwale, S.; Prakash, D.; Gajbhiye, M.; Jagdale, S.; Patil, N.; KapADNIS, B. BVPaP-3, a T7-like lytic phage of *Pseudomonas aeruginosa*: its isolation and characterization. **Current Microbiology**, v.64, p.305–311, 2012.

Avicultura Industrial. Brasil aumentará substancialmente a produção para suprir a demanda global, aponta USDA. [S. l.], 2022. Available at: <https://www.aviculturaindustrial.com.br/imprensa/brasil-aumentara-substancialmente-a-producao-para-suprir-a-demanda-global-aponta/20220414-105009-C990>. Acesso em: 26 maio 2022.

BRASIL, F. F. M. L. F. R. B. F. L. G. R. B. L. U., RS. **Avaliação do Método Fermentativo da Cama de Aviário**. Disponível em: <<https://pt.engormix.com/avicultura/artigos/metodo-fermentativo-cama-aviario-t36741.htm#:~:text=O%20processo%20fermentativo%20diminiu%20o>>. Acesso em: 5 set. 2023.

Francisco Giroto, a.; Silveira de Avila, V. **Importância econômica**: Aspéctos da produção, exportação, consumo e custos de produção e implantação de aviários. [S. l.], 2003. Available at: <http://www.cnpsa.embrapa.br/SP/aves/Importancia-economica.html>. Acesso em: 26 maio 2022.

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>.

Guenther, S. et al. Biocontrol of *Salmonella Typhimurium* in RTE foods with the virulent bacteriophage FO1-E2. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v.154, n. 1–2, p. 66–72, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.023>

Howard-Varona, C.; et al. Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages. **The ISME Journal** 2017 11:7, [S. l.], v. 11, n. 7, p. 1511–1520, 2017.

Jianxiong, Y. E. et al. Control of *Salmonella* on sprouting mung bean and alfalfa seeds by using a biocontrol preparation based on antagonistic bacteria and lytic bacteriophages. **Journal of Food Protection**, [s. l.], v. 73, n. 1, p. 9–17, 2010. Available at: <https://doi.org/10.4315/0362-028x-73.1.9>

Middelboe, M.; Chan, A. M.; Bertelsen, S. K. Isolation and life cycle characterization of lytic viruses infecting heterotrophic bacteria and cyanobacteria. In S.W. Wilhelm, M.G. Weinbauer, Suttle CA (ed), **Manual of Aquatic Viral Ecology**, 2010.

Sampaio, G. V.; Gabiatti, N. C.; Prá, M. C. De. **Isolamento de bacteriófagos para o controle de *Salmonella* spp. em cama de aviário**. UTFPR, 2022, Dois Vizinhos.

Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D.L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outterson, K., Patel, J., Cavaleri, M., Cox, E.M., Houchens, C.R., Grayson, M.L., Hansen, P., Singh, N., Theuretzbacher, U., Magrini, N., Aboderin, A.O., Al-Abri, S.S., Awang Jalil, N., Benzonana, N., Bhattacharya, S., Brink, A.J., Burkert, F.R., Cars, O., Cornaglia, G., Dyar, O.J., Friedrich, A.W., Gales, A.C., Gandra, S., Giske, C.G., Goff, D.A., Goossens, H., Gottlieb, T., Guzman Blanco, M., Hryniewicz, W., Kattula, D., Jinks, T., Kanj, S.S., Kerr, L., Kieny, M.P., Kim, Y.S., Kozlov, R.S., Labarca, J., Laxminarayan, R., Leder, K., Leibovici, L., Levy-Hara, G., Littman, J., Malhotra-Kumar, S., Manchanda, V., Moja, L., Ndoye, B., Pan, A., Paterson, D.L., Paul, M., Qiu, H., Ramon-Pardo, P., Rodríguez-Bano, J., Sanguinetti, M., Sengupta, S., Sharland, M., Si-Mehand, M., Silver, L.L., Song, W., Steinbakk, M., Thomsen, J., Thwaites, G.E., van der Meer, J.W., van Kinh, N., Vega, S., Villegas, M. V., Wechsler-Ford, A., Wertheim, H.F.L., Wesangula, E., Woodford, N., Yilmaz, F. O., Zorzet, A., 2018. **Discovery, research, and development of new antibiotics**: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* 18, 318–327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3).

Zhang, H.-Z., Shu, M., Yang, W.-Y., Pan, H., Tang, M.-X., Zhao, Y.-Y., Zhong, C., & Wu, G.-P. (2023). Isolation and characterization of a novel *Salmonella* bacteriophage JNwz02 capable of lysing *Escherichia coli* O157:H7 and its antibacterial application in foods. **LWT.**, Caxambu, 2010, p 34-38.