



SEI-SICITE 2021

Pesquisa e Extensão para um mundo em transformação

Isolamento de bacteriófagos contra *Aeromonas Hydrophila* resistente à antibiótico

ISOLATION OF BACTERIOPHAGE AGAINST ANTIBIOTIC RESISTANT AEROMONAS HYDROPHILA

Douglas Bressane Caetano*, Naiana Cristine Gabiatti†,
Gabrielli Vaz Sampaio‡, Guilherme Fortini Sanches§

RESUMO

A aquicultura vem se destacando economicamente no Brasil, desta forma demandando de alternativas para melhorar qualitativa e quantitativamente sua produção. A partir disso, aplicar soluções que visam aumentar a produtividade e que tenha menor impacto ambiental é de extrema importância. Os bacteriófagos, vírus que infectam bactérias, aparecem como alternativa no controle de infecções bacterianas, dentre elas, a provocada pela *Aeromonas hydrophila*, bactéria gram-negativa que infecta animais aquáticos. Para isso, o primeiro passo é o do isolamento do bacteriófago da bactéria em questão. Foi feito o enriquecimento da amostra ambiental coletada juntamente com uma amostra de *Aeromonas h.* em meio líquido. Depois, realizou-se o teste de placa de lise para identificar a presença do fago. Por fim, através do *Drop Spot test*, observou-se a infectabilidade do fago. Foi possível isolar o bacteriófago infectante da *Aeromonas hydrophila*, entretanto, sua eficiência de infecção foi relativamente baixa, impossibilitando sua aplicação direta no controle de infecções.

Palavras-chave: Bacteriófago, Aeromonas, Isolamento, Resistência, Antibiótico.

ABSTRACT

Aquaculture has been increasing economically in Brazil, thus demanding alternatives to improve its production qualitatively and quantitatively. Based on this, applying solutions that aim to increase productivity and have a lower environmental impact is extremely important. Bacteriophages, viruses that infect bacteria, appear as an alternative in the control of bacterial infections, including that caused by *Aeromonas hydrophila*, a gram-negative bacteria that infects aquatic animals. For this, the first step is to isolate the bacteriophage from the bacteria in question. The environmental sample collected together with a sample of *Aeromonas h.* in a liquid medium. Then, the lysis plaque test was performed to identify the presence of the phage. Finally, through the *Drop Spot test*, the infectability of the phage was observed. It was possible to isolate the infecting bacteriophage from *Aeromonas hydrophila*, however, its infection efficiency was relatively low, making its direct application in infection control impossible.

Keywords: Bacteriophage, Aeromonas, Isolation, Resistance, Antibiotic.

1 INTRODUÇÃO

* Engenharia de bioprocessos e biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; bressanecaetano@gmail.com

† Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos; naianagabiatti@utfpr.edu.br

‡ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; gabriellisampaio@alunos.utfpr.edu.br

§ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; guifortini@gmail.com



A aquicultura consiste na criação de animais aquáticos em determinado espaço (EMBRAPA, 2012). No Brasil, a aquicultura foi um dos setores que mais apresentou crescimento na produção dentre o período de 2004 a 2014, com um aumento de 8%; em comparativo, a produção de carne bovina foi de 5,1%, de carne de porco foi de 2,9% e de carne de frango foi de 4,1% (KUBITZA, *et al*, 2015). Ainda, em 2018, a aquicultura no Brasil alcançou o total de 579 mil toneladas produzidas (PEDROZA.; *et al*, 2020)

Com a aquicultura em ascensão, uma das maiores interferências na produção são infecções bacterianas, especialmente por *Aeromonas hydrophila* (LIU, *et al*. 2020). Esta bactéria gram-negativa infecta não somente animais aquáticos como peixes, crustáceos e moluscos, mas também seres humanos (SAPKOTA, *et al*. 2008)

Dentro da aquicultura, o principal meio de controle utilizado para contaminação microbiana no ambiente é o uso de antibióticos (OROZOVA, *et al*. 2008). Os antibióticos são fármacos capazes de inibir o crescimento bacteriano e causar a morte celular (GUIMARÃES, *et al*, 2010). Ainda que utilizado desde o século XIX, seu desenvolvimento e aplicação popularizou-se com a descoberta da penicilina, em 1928, por Alexander Fleming (NICOLAOU, *et al*, 2008).

Com o uso indiscriminado de antibióticos, houve um aumento no desenvolvimento de resistência antimicrobiana em meios aquáticos (HILTUNEN, *et al*, 2017). Além disso, a contaminação das águas pelo medicamento, oriundos de descarte de dejetos de animais tratados, esgoto doméstico e de solos contaminados potencializa o surgimento e dispersão de cepas resistentes (PINTO, *et al*, 2019; VIKESLAND *et al* 2017).

Uma das formas estudadas nos últimos anos para atuar como alternativa para os antibióticos no controle do crescimento bacteriano é a aplicação de bacteriófagos, vírus capazes de infectar as bactérias hospedeiras e, após se replicar de forma eficiente no seu interior, causar a lise celular (TORRES-BARCELÓ, *et al*, 2018). Suas aplicações em estudos com bons resultados vão desde tratamento médico (KORZENIEWSKA, *et al*, 2013) até a utilização em meios aquáticos (DE CARVALHO, *et al*, 2016).

O isolamento de fagos em ambientes aquáticos pode ser um desafio, uma vez que pode ser necessário trabalhar com grandes volumes amostrais. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi isolar fagos que infectam bactérias, a partir de amostras provenientes de açudes de criação de tilápia da UNEPE piscicultura na UTFPR-DV. Logo, seria possível o isolamento do bacteriófago proveniente de amostras aquáticas de aquicultura?

2 MÉTODO

Primeiramente, foi feita a coleta de amostras da Unidade de Ensino e Pesquisa em Piscicultura (UNEPE) na UTFPR – campus Dois Vizinhos. Cada amostra possuía o total de um litro da água proveniente dos tanques de criação de peixes. Os experimentos seguintes foram realizados no Laboratório laboratórios de Engenharia de Bioprocessos (LAPRO) e no Laboratório de Biotecnologia Ambiental e de Alimentos (LABIA), também na UTFPR- campus Dois Vizinhos.

Com a amostra, passou-se para o procedimento de enriquecimento, com o intuito de aumentar tanto a concentração da bactéria quanto de um possível fago infectante. Iniciou-se pela preparação do caldo nutriente (Nutrient Broth – 13 g/L), utilizando-se de 150ml do caldo, 150ml da amostra ambiental e 5ml de cultura líquida de *Aeromonas hydrophila*. A cultura líquida foi previamente preparada, sendo incubada por 12 horas à 30°C, com o intuito de utiliza-la em sua fase exponencial. A amostra enriquecida foi incubada em *shaker* (Incubadora Shaker Refrigerada SL-223/SOLAB) por um período de 18 horas com rotação à 120 rpm.

Depois do enriquecimento da amostra, foi feito o preparo do estoque heterogêneo dos bacteriófagos, que consiste no isolamento inicial dos bacteriófagos presentes, sem especificação de hospedeiro. Isso foi feito com a retirada de 10ml da amostra enriquecida, colocada em tubos do tipo falcon. Adicionou-se 500µl de



clorofórmio (5% v/v) com o intuito de induzir a lise celular das bactérias presentes. Agitou-se os tubos em vortex por 2 minutos e, em seguida, os tubos foram centrifugados em uma centrífuga de bancada (Centrífuga de Bancada Digital Novatecnica NT 810) à 3000rpm por 10 minutos. Após este período, foi retirado o sobrenadante e transferido para microtubos.

Com o estoque heterogêneo foi realizada a etapa de isolamento em meio sólido, através do teste de placa de lise, que tem por finalidade observar a presença do bacteriófago. Com isso, foram feitas placas de dupla camada que consiste em uma primeira camada de ágar (PCA - 23,5g por 1L) e uma segunda camada com soft ágar (10g/l de Tryptona, 9g/l de ágar ágar e 5g/l de KCl), a qual foi adicionado 100µl do estoque heterogêneo de fagos e 100µl de cultura líquida de *Aeromonas*. Ambos foram adicionados ao soft ágar ainda em estado líquido em uma temperatura de 40°C. As placas foram incubadas em estufa microbiológica (Estufa Bacteriológica SL – 101), a 30°C por um período de 24 horas.

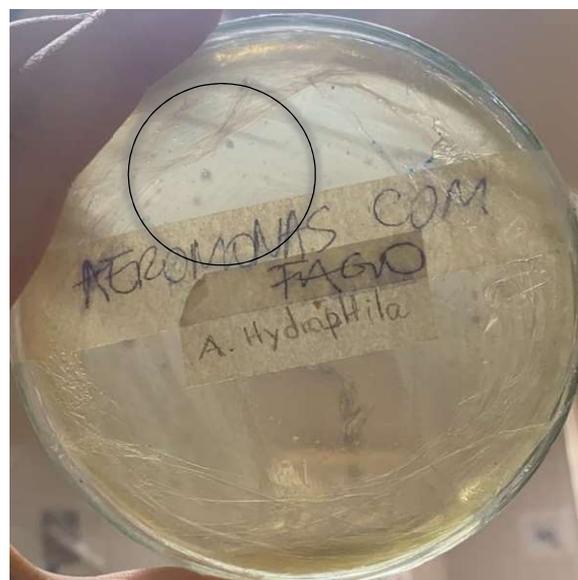
Após o período de incubação, foi feito o estoque homogêneo de fagos. Foram retirados das placas, amostras de onde ocorreu a lise celular da *Aeromonas*. Estas amostras foram colocadas em microtubos contendo 1000µl de buffer (SMB, 5,2 g / l de cloreto de sódio, 2 g / l de sulfato de magnésio, 6,35 g / l de Tris-HCL, 1,18 g / l de Tris base e 0,01% de solução de gelatina, com pH ajustado para 7,5). Os microtubos foram agitados em vortex por 5 minutos e, após este período, foram adicionados 50µl de clorofórmio (5% v/v) e foram centrifugados por 10 minutos à 7000rpm. Por fim, transferiu-se o sobrenadante para novos microtubos.

Para a confirmação do espectro de hospedeiros, realizou-se o *Drop Spot Test*, que consiste na aplicação do fago em determinada área da placa em dupla camada. Para isso, foram feitas placas de ágar com uma segunda camada de soft ágar contendo apenas 200µl de cultura líquida de *Aeromonas hydrophila*, mantido em banho-maria à uma temperatura de 40°C. Ao fim da secagem da dupla camada, foi adicionado 10µl do estoque de bacteriófagos em uma área delimitada, a fim de observar sua atuação.

3 RESULTADOS

Na primeira parte do isolamento, através do teste de placas de lise, foi possível verificar a presença das manchas transparentes características, que podem ser observadas na Figura 1 abaixo:

Figura 1 – Placas de lise





Fonte: Autoria própria (2021)

O resultado positivo para placas de lise indica a presença de bacteriófago, vindo da amostra original, que infecta a bactéria testada (CLOKIE; KROPINSKI. 2009). Apesar do isolamento tender a ser uma etapa relativamente demorada do processo, com várias tentativas em diferentes amostras, a presença de bacteriófagos na amostra ambiental, meio natural de crescimento de *Aeromonas h.* não é uma surpresa. Estes vírus são as entidades mais abundantes do planeta e co-evoluem junto aos seus hospedeiros (LABRIE, et al. 2010), portanto, todo ambiente com a presença de bactérias, terá a presença invariavelmente de fagos (CLOKIE et al 2011). Um exemplo disso é o estudo realizado por Bilen (2019), onde foi realizado o isolamento dos bacteriófagos infectantes de *Aeromonas h.* em Truta-arco-íris. Além do isolamento, foi realizado a caracterização do fago e, com isso, foi possível identificar diversas características tal como o espectro de hospedeiro, taxa de adsorção e efeitos de inativação do fago. O isolamento ocorreu com amostras de esgoto, diferindo do trabalho atual, que busca uma amostra proveniente dos tanques de criação dos peixes. Assim, é possível observar como o bacteriófago pode ser encontrado em diversos ambientes.

Com o *Drop Spot Test* (Figura 2) foi possível confirmar que a *Aeromonas hydrophila* é microrganismo hospedeiro do vírus. No entanto, a baixa resolução da área clara (que em muitos casos fica totalmente transparente) indica que a eficiência de infecção é relativamente baixa.

Imagem 2 – Placa do *Drop Spot Test* com placa de lise



Fonte: Autoria própria (2021)

Este resultado pode indicar que o fago isolado não é um bom candidato para ser utilizado como agente antimicrobiano, uma vez que o sucesso do controle biológico depende da aplicação de vírus com alta capacidade de infecção junto a estratégias bem elaboradas (MATHIEU, et al. 2019).

Tratando-se da infectabilidade do bacteriófago, destacam-se dois ciclos: lítico e lisogênico. Em ambos, o fago adere-se a parede celular da bactéria e insere o material genético. Com isso, utiliza-se do mecanismo celular da bactéria para se reproduzir (HENDRIX, et al. 2003). No ciclo lítico, mais indicado para uso de fagos no controle do crescimento microbiano (PARK, et al. 2012), ocorre a lise celular da bactéria, com a finalidade de liberar a progênie presente no interior celular. Alguns trabalhos já mostraram que, mesmo o fago sendo de



ciclo lítico, ele pode ter uma baixa taxa de adsorção ou liberar uma baixa quantidade de cópias após infectar a célula, não apresentando resultados satisfatórios na inibição do crescimento bacteriano (CHAN, *et al.* 2013).

4 CONCLUSÃO

Com o aparecimento das placas de lise no *Drop Spot Test*, compreende-se que o bacteriófago isolado da amostra ambiental é capaz de infectar a *Aeromonas Hydrophila* e causar lise celular. Dessa forma, é possível concluir que houve o isolamento do bacteriófago desejado, porém mais estudos são necessários para elucidar se este pode ser utilizado como ferramenta de biocontrole explorando possíveis aplicações e estudos dentro da UTFPR - campus Dois Vizinhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos e ao Laboratório de Biotecnologia Ambiental e de Alimentos (LABIA).

REFERÊNCIAS

- BILEN, Soner; ELBESHTI, Housam Taher Abdul Ghani. A new potential therapeutic remedy against *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using tetra, *Cotinus coggygria*. **Journal of fish diseases**, v. 42, n. 10, p. 1369-1381, 2019.
- CHAN, Benjamin K; ABEDON, Stephen T; LOC-CARRILLO, Catherine, Phage cocktails and the future of phage therapy, **Future Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 769–783, 2013.
- CLOKIE, Martha R.J.; KROPINSKI, Andrew M. (Orgs.). **Bacteriophages**. Totowa, NJ: Humana Press, 2009. (Methods in Molecular Biology). Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-1-60327-164-6>>. Acesso em: 5 set. 2021
- CLOKIE, Martha R.J.; MILLARD, Andrew D.; LETAROV, Andrey V.; *et al.* Phages in nature. **Bacteriophage**, v. 1, n. 1, p. 31–45, 2011.
- DE CARVALHO, Carolina Tavares; JUNIOR, Robélio Mascoli; AMÉRICO-PINHEIRO, Juliana Heloisa Pinê. O uso indiscriminado de antibióticos e os impactos nos ambientes aquáticos. **Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 12, n. 2, 2016.
- GUIMARÃES, Denise Oliveira; MOMESSO, Luciano da Silva; PUPO, Mônica Tallarico. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.
- HENDRIX, Roger W, Bacteriophage genomics, **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 5, p. 506–511, 2003.
- HILTUNEN, Teppo; VIRTÁ, Marko; LAINE, Anna-Liisa. Antibiotic resistance in the wild: an evolutionary perspective. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 372, n. 1712, p. 20160039, 2017.



- KORZENIEWSKA, Ewa; KORZENIEWSKA, Anna; HARNISZ, Monika. Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emission to the environment. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 91, p. 96-102, 2013.
- KUBITZA, Fernando; CAMPOS, J. L. Aquicultura no Brasil. **Conquistas e Desafios. Panorama da Aquicultura**, v. 25, n. 150, p. 11-13, 2015.
- LABRIE, Simon J.; SAMSON, Julie E.; MOINEAU, Sylvain. Bacteriophage resistance mechanisms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 5, p. 317–327, 2010.
- LIU, Jin; GAO, Shanshan; DONG, Yuhao; *et al.* Isolation and characterization of bacteriophages against virulent *Aeromonas hydrophila*. **BMC Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 141, 2020.
- MATHIEU, Jacques; YU, Pingfeng; ZUO, Pengxiao; *et al.* Going Viral: Emerging Opportunities for Phage-Based Bacterial Control in Water Treatment and Reuse. **Accounts of Chemical Research**, v. 52, n. 4, p. 849–857, 2019.
- NICOLAOU, Kyriacos C.; MONTAGNON, Tamsyn. **Molecules that changed the World: a brief history of the art and science of synthesis and its impact on society**. Weinheim: Wiley-VCH, 2008.
- OROZOVA, P. *et al.* Antibiotic resistance of potentially pathogenic *Aeromonas* strains. **Trakia journal of sciences**, v. 6, n. 1, p. 71-77, 2008.
- PARK, Minjung *et al.* Characterization and Comparative Genomic Analysis of a Novel Bacteriophage, SFP10, Simultaneously Inhibiting both *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 1, p. 58–69, 2012.
- PEDROZA FILHO, Manoel Xavier; DE SOUZA FERREIRA FILHO, Joaquim Bento; JÚNIOR, Marcos Antonio Gomes Pena. Impactos Socioeconômicos Da Aquicultura No Brasil: Análise A Partir Da Matriz De Contabilidade Social. **Revista Econômica do Nordeste**, v. 51, n. 4, p. 159-176, 2020.
- PINTO, Natália Bitu; LUSTOSA, Jacqueline Pires Gonçalves; FERNANDES, Maria do Carmo de Alustau. O descarte incorreto de fármacos e seus impactos no meio ambiente e na saúde pública. **Revista de Pesquisa Interdisciplinar**, v. 2, n. 2.0, 2019. Disponível em: <<https://cfp.revistas.ufcg.edu.br/cfp/index.php/pesquisainterdisciplinar/article/view/357>>. Acesso em: 7 set. 2021
- SAPKOTA, Amir; SAPKOTA, Amy R.; KUCHARSKI, Margaret; *et al.* Aquaculture practices and potential human health risks: Current knowledge and future priorities. **Environment International**, v. 34, n. 8, p. 1215–1226, 2008.
- TORRES-BARCELÓ, Clara. The disparate effects of bacteriophages on antibiotic-resistant bacteria. **Emerging Microbes & Infections**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2018.
- VIKESLAND, Peter J.; PRUDEN, Amy; ALVAREZ, Pedro J. J.; *et al.* Toward a Comprehensive Strategy to Mitigate Dissemination of Environmental Sources of Antibiotic Resistance. **Environmental Science & Technology**, v. 51, n. 22, p. 13061–13069, 2017.
- Pesca e Aquicultura - Portal Embrapa**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/tema-pesca-e-aquicultura/nota-tecnica>>. Acesso em: 7 set. 2021.