ISBN: 9786588884546

ISOLAMENTO DE BACTERIÓFAGOS EM ISOLADOS BACTERIANOS COLETADOS EM ÁGUAS NATURAIS

ELISABETE JOSÉ VICENTE; MARIA REGINA LORENZETTI SIMIONATO; GUSTAVO MARQUES; ADOLFO TADEU BARBOSA

RESUMO

Introdução: Bacteriófagos (fagos) são vírus que infectam procariontes (bactérias e arquéias) e somente são capazes de se replicar dentro desses microrganismos infectados. Eles são muito específicos para as espécies e mesmo para diferentes linhagens que podem infectar. Os virulentos multiplicam-se somente pelo ciclo lítico; e os temperados podem seguir o ciclo lisogênico ou o lítico. Os fagos são as entidades biológicas mais abundantes e diversas da biosfera, são encontrados onde quer que exista bactérias e estima-se haver mais de 10^{31} partículas fágicas no planeta. O objetivo deste trabalho foi analisar, em águas urbanas, a presença de bactérias resistentes aos antibióticos e a presença de fagos líticos e de fagos lisogênicos inseridos no genoma de bactérias; visando num trabalho futuro identificar novos compostos que tenham a capacidade de induzir a entrada no ciclo lítico de isolados bacterianos MDR. Métodos: Foram seguidas as seguintes Etapas: 1) Foram feitas coletas amostras de 50 ml de água de várias localidades urbanas; 2) diluições foram semeadas em diferentes meios de cultura sólido; 3) colônias isoladas foram palitadas em meios com e sem antibióticos em concentrações inibitórias (MIC) e Sub-MIC (aprox. 100X < MIC) incapaz de impedir o cultivo de *E. coli* C 600 (indutora de resposta SOS). Os Resultados indicam: 1) A concentração de enterobactérias presentes nas águas coletadas variou entre $1x10^2$ e $1x10^4$ UFC; 2) 53% das bactérias das colônias se mostram resistentes a Ampicilina; 3) Nas amostras analisadas havia fagos que permitiram a obtenção entre 5.10^4 - 2.10^5 UFPL (unidades formadoras de placas de lise); 4) presuntivamente, 57% das bactérias isoladas continham fagos lisogênicos, sendo que dentre as bactérias Amp^R, 20% continham fagos lisogênicos. Conclusão: As técnicas empregadas foram eficazes para detecção de fagos líticos e de bactérias resistentes a antibióticos contendo fagos lisogênicos. Numa etapa posterior, a liberação desses fagos temperados será comprovada empregando "top-agar" com bactérias sensíveis à infecção.

Palavras-chave: fagos liticos e lisogênicos, fagoterapia; bactérias multi-resistentes(MDR).

1 INTRODUÇÃO

Os bacteriófagos (fagos) são vírus que infectam procariontes (bactérias e arquéias) e somente são capazes de se replicar dentro desses microrganismos infectados. São muito específicos para as espécies e mesmo para as linhagens de procariotos que podem infectar. Considera-se que os fagos foram descobertos em 1915 por William Twort que observou atividade antibacteriana promovida por filtrados de água (TWORT, 1915). Em 1917, o canadense Félix D'Herelle, que então estava no Instituto Pasteur de Paris, descreveu a lise de células da bactéria *Shigella* em cultura pelo que denominou "partículas" de "bacteriófagos" ("partículas e não proteínas comedoras de bactérias") (Chanishvili, 2012; D'Herelle, 2007;

DOI: 10.51189/iv-ensipex/50888

ISBN: 9786588884546

Roux, 2011). D'Hérelle desenvolveu vários protocolos de isolamento de bacteriófagos e demonstrou seu potencial de uso terapêutico.

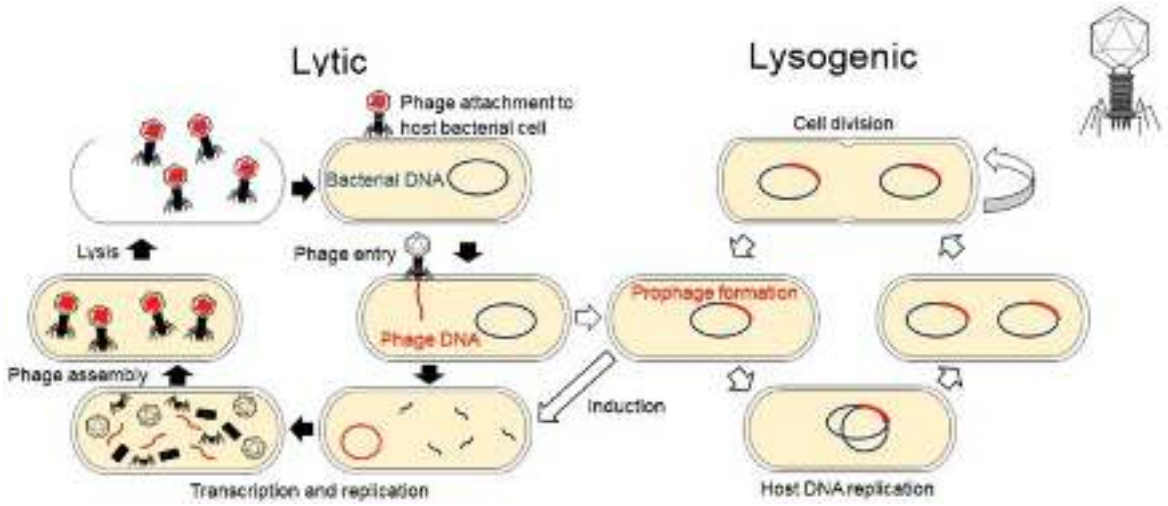
Os fagos são as entidades biológicas mais abundantes e diversas da biosfera, são encontrados em água doce, salgada, solo, como parte da microbiota de animais, ou seja, onde quer que exista procariotos e arqueias e estima-se haver mais de 10^{31} partículas fágicas no planeta (Clokie *et al.*, 2011; Mu; Lawley, 2023).

Os fagos podem ser classificados pelo tipo de ciclo celular, pelas suas características morfológicas, sendo que a grande maioria dos fagos conhecidos tem cauda. Atualmente, o "Bacterial Virus Subcomite" (BVS) do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus" (ICTV) estabelece as regras de classificação dos fagos considerando sua sequência genômica (Turner *et al.*, 2023).

Considerando o tipo de ciclo celular, há dois tipos de fagos: os virulentos e os temperados. Os fagos virulentos multiplicam-se somente pelo chamado ciclo de vida lítico (ciclo lítico) e assim que eles inserem o seu genoma no interior de uma bactéria, provocam sua lise em poucos minutos, liberando dezenas ou centenas de partículas fágicas (*virions*).

Os fagos temperados, assim que inserem o seu genoma no interior de uma bactéria hospedeira, podem seguir dois caminhos: parte da população seguirá o ciclo lítico, e parte da população seguirá o ciclo lisogênico, e a porcentagem dos fagos que seguem cada um desses dois caminhos depende de várias condições como, concentração de *vírions*/concentração de células da bactéria hospedeira (MOI), e da concentração de nutrientes (Harper *et al.*, 2021).

Figura 1: Ciclos de vida de bacteriófagos: fagos líticos se ligam e infectam uma célula bacteriana resultando na reprodução de fagos e a lise da célula hospedeira; e, o ciclo lisogênico resulta na integração de um genoma de fago no genoma bacteriano. Alguns fagos lisogênicos não se integram ao genoma e permanecem na célula como um plasmídeo circular ou linear (não representado aqui).



Fonte: Deed - Attribution 4.0 International - Creative Commons.

Quando um fago temperado "decide" seguir o ciclo lisogênico infeccioso, o seu genoma permanece junto ao genoma da bactéria hospedeira na forma de um profago e lá permanece estável por inúmeras gerações descendentes desta célula bacteriana até o momento que uma dessas células seja submetida a um ambiente de estresse que comprometa sua sobrevivência, como radiação, temperatura elevada, incubação com fármacos ou substâncias genotóxicas e, nesse momento, esse profago entra no ciclo lítico (Campbell, 2003), Figura 1.

A estratégia de usar fagos bacteriolíticos em terapia humana ou animal (fagoterapia) e

DOI: 10.51189/iv-ensipex/50888

ISBN: 9786588884546

para o controle de pragas de plantas é vista atualmente como uma abordagem promissora para tratar infecções causadas por bactérias resistentes a muitos antibióticos ("multidrug resistant"-MDR), problema de enorme importância atual (Durr; Leipzig, 2023).

A terapia com fagos terapêuticos ainda está em fase experimental em muitos países, mas há um crescente interesse no seu potencial como terapia para infecções bacterianas resistentes aos antibióticos incluindo principalmente septicemia (*Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa*), infecções gastrointestinais (*E. coli*, *Salmonella, Vibrio cholerae*), respiratórias (*Mycobacterium, Klebsiella pneumoniae*), pele e ouvido (*Staphylococcus*), além de infecções em animais (Swenson; Gonzalez; Steen, 2024).

No Brasil, embora a fagoterapia esteja documentada desde 1921, com a chegada dos antibióticos caiu em desuso a partir dos anos 1940 (Almeida, 2023; Almeida; Sundberg, 2020). Atualmente, devido ao número crescente de países criando uma "trilha paralela" que permite o uso compassivo caso a caso (requer autorização legal específica) da terapia de fagos, especialmente quando as opções de antibióticos falham, é possível se fazer uso da fagoterapia. Assim a relevância imediata do desenvolvimento de coleções de fagos, do desenvolvimento das técnicas de isolamento de fagos e de coquetéis de fagos terapêuticos patógeno-específicos.

A maioria dos trabalhos consideram os potenciais biotecnológicos dos fagos líticos e de suas proteínas holina e endolisina (Rahman *et al.*, 2021; Wang; Smith; Young, 2000; Young; Bläsi, 1995), somente alguns trabalhos ainda mais recentes consideram os fagos lisogênicos como alternativa terapêutica (Zhou *et al.*, 2023). Um trabalho pioneiro revelou haver um enriquecimento significativo de fagos lisogênicos e de profagos portadores de genes de resistência a antibióticos (ARGs) em *habitats* com provável maior risco de exposição a antibióticos devido à atividade humana (Liao *et al.*, 2024).

O objetivo deste trabalho foi realizar uma análise preliminar em algumas amostras de água urbanas coletadas de diferentes localidades em SP, para prospecção de: **1**) bactérias totais e da porcentagem dessas bactérias resistentes a antibióticos; **2**) fagos líticos, seguindo um protocolo muito simples de isolamento; e, **3**) realizar uma análise preliminar da presença profagos inseridos no genoma de bactérias resistentes aos antibióticos. Tudo isso visando, no futuro, estabelecer uma correlação da resistência a antibióticos/fago lisogênico e também considerar a indução do ciclo lítico dos fagos temperados como uma possível alternativa terapêutica antibacteriana.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram seguidas as seguintes Etapas: 1) Coleta e armazenamento de amostras de águas: Foram realizadas coletas de amostras de 50 ml de águas de várias localidades urbanas (2 Lagos em Praças, 2 pequenos rios, filtro caseiro, Raia USP, etc.); essas foram transportadas ao laboratório e, após sedimentação por 10 min à temperatura ambiente, foram transferidas para dois tubos esterilizados de 20 ml e armazenados em geladeira por no máximo 3 dias;

2) <u>Isolamento de bactérias das amostras</u>: 0,1 ml de diluições seriadas (ND, 10^{-1} - 10^{-5}) das amostras foram semeadas em diferentes meios de cultura (LA ou TSA, Ágar MacConkey, Ágar Manitol salgado) (Sambrook; Russel, 2001);

3) <u>Análise da resistência a antibiótico das bactérias isoladas</u>: colônias foram palitadas para os meios MacConkey ("master plate") e TSA+Ampicilina 100µg/ml;

4) <u>Isolamento de fagos líticos</u>: foi empregado uma metodologia bem conhecida (Cappuccino; Welsh, 2018), com simplificações: Num tubo esterilizado de 20 ml, foram incubados 2 ml da amostra de água + 2 ml de cultura *E. coli* C600 em fase exponencial de crescimento + 200 µl de LB 10X. Após a agitação, a mistura foi incubada em estufa a 37 ^{o}C por diferentes intervalos de tempo, para que ocorresse o aumento do título de fagos infectantes da bactéria que seria empregada como testadora/sensível ao fago, *E. coli* C600. A mistura foi submetida a filtração em membrana 0,22 µm, o filtrado coletado em microtubos

DOI: 10.51189/iv-ensipex/50888

ISBN: 9786588884546

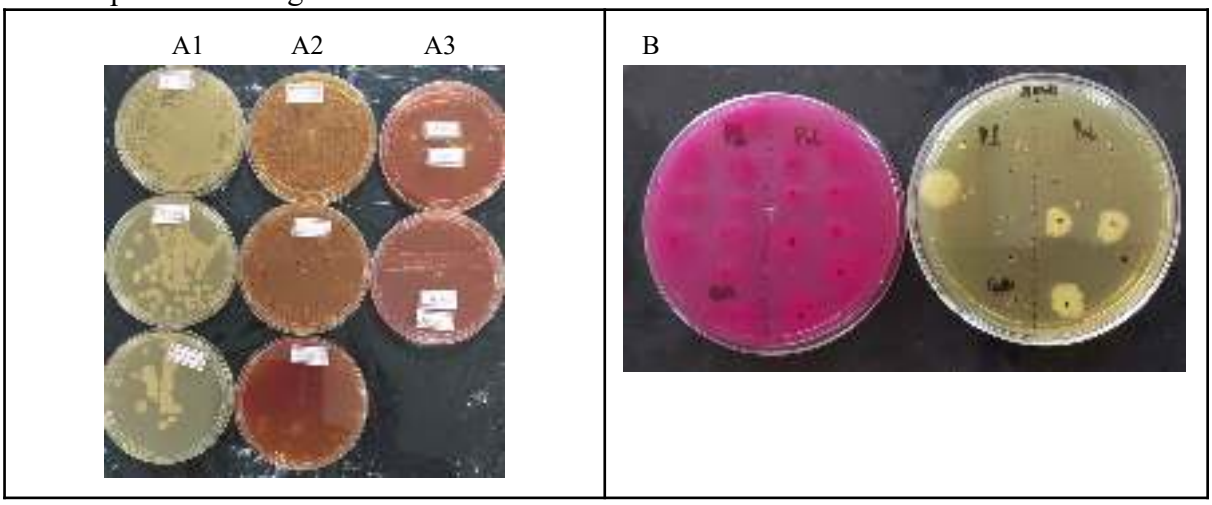
"Eppendorf" e feitas diluições (ND, 10^{-1} - 10^{-5}). Foram misturados: 200 µl de cada diluição do filtrado contendo fagos + 200 µl de cultura *E. coli* C600 + 3 ml de meio LB com 0,6% agar a 45 ^{o}C e, imediatamente após agitação entre as palmas das mãos, a mistura foi vertida para placas contendo meio sólido LA (Vicente; Simionato, M.R.L; Ferreira, R.C., 2023). Após o "top-agar" ter solidificado (5 minutos), as placas foram incubadas a 37 ^{o}C, em estufa.
5) Análise da presença de profago: colônias isoladas foram palitadas para MacConkey+Ciprofloxacina 25µg/ml (Sub-MIC = aprox. 100X < MIC, que funciona como indutor de resposta de reparo SOS). A concentração sub-MIC de Ciprofloxacina utilizada foi incapaz de impedir o cultivo de *E. coli* C600, e a falha de crescimento de isolados bacterianos nesse meio foi presuntivamente atribuída à presença de fago lisogênico (Doss *et al.*, 2017; Sutcliffe *et al.*, 2021).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento de bactérias

A partir das diferentes amostras de água coletadas, foram isoladas colônias de bactérias nos diferentes meios de cultura sólido utilizados. A concentração de enterobactérias, baseado no número das colônias que cresceram em Ágar MacConkey, variou entre $1x10^2$ e $1x10^4$ UFC (Figura 2 A). 53% das bactérias isoladas se mostraram resistentes à 100µg/ml de Ampicilina, sendo essa uma concentração muito elevada desse antibiótico (Figura 2B).

Figura 2: Isolamento de bactérias e análise da porcentagem resistente a antibióticos de amostras das águas: **A**) Placas com os meios de cultura (**A1**, LA; **A2**, MacConkey, **A3**, Ágar manitol salgado) onde foram cultivadas diluições das amostras de águas (ND, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}); **B**) colônias palitadas em réplicas semeadas em meio MacConkey e em meio LA+Ampicilina 100mg/ml.



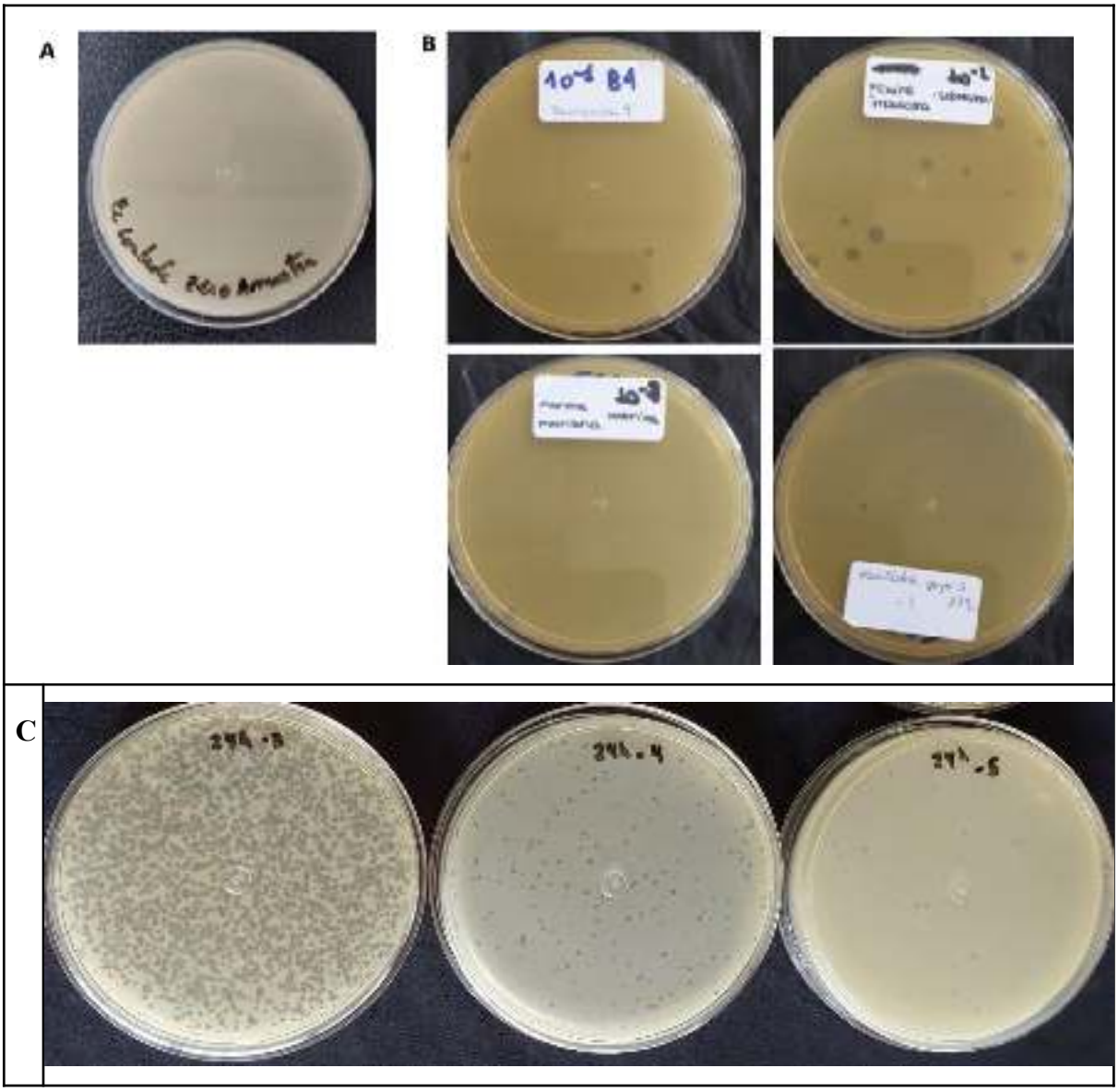
Isolamento de fagos líticos

Nas amostras de água analisadas havia fagos capazes de infectar e utilizar *E. coli* C600 como bactéria hospedeira. A metodologia empregada permitiu a obtenção de cerca de $1,2x10^3$ UFPL (unidades formadoras de placas de lise), após enriquecimento por 2 horas (Figura 3 B); e, de $1x10^7$ UFPL, após enriquecimento por 24 horas (Figura 3 C).

DOI: 10.51189/iv-ensipex/50888

ISBN: 9786588884546

Figura 3: Placas de lise de fagos após períodos de incubação da amostra de água com bactéria *E. coli* C600 (enriquecimento) por: **A**) Controle sem adição da amostra de água; **B**) Incubação da amostra de água com bactéria (enriquecimento) por 2 horas, seguida de semeadura das diluições: ND, 10^{-1}, 10^{-2}; **C)** por 24 horas, e Semeadura das diluições: 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}.



Evidência de presença de fagos lisogênicos nas bactérias resistentes a antibióticos isoladas das amostras de água

Nossa análise permitiu evidenciar que aproximadamente 57% das bactérias isoladas das amostras de água continham fagos lisogênicos, sendo que dentre as bactérias Amp^R, 20% continham fagos lisogênicos (Figura 4). Esses resultados foram tomados como presuntivos pois: 1) o número de amostras analisado foi pequeno (aprox. 300 colônias de bactérias); e, 2) se faz necessária a confirmação de que a lise observada das bactérias submetidas a concentrações sub-Mic de Ciprofloxacina foi decorrente de fato da indução do ciclo lítico de profagos inseridos nos genomas desses isolados.

DOI: 10.51189/iv-ensipex/50888

ISBN: 9786588884546

Figura 4: Placas com os meios de cultura: A) MacConkey, B) LA+Ampicilina 100mg/ml e C) LA+Ciprofloxacina 25mg/ml ((Sub-MIC), onde foram palitadas réplicas de colônias isoladas das amostras de água.

4 CONCLUSÃO

As técnicas empregadas foram eficazes para detecção de fagos líticos, de bactérias, de bactérias resistentes a antibióticos e a evidenciação da presença de fagos lisogênicos inseridos dentro dessas bactérias. Provavelmente os fagos líticos e lisogênicos desempenham um importante papel no equilíbrio da população bacteriana nas águas. Observamos que as chuvas influenciam a concentração de bactérias e de fagos nas águas pois quando a coleta de amostras de água é realizada após 3 dias sem chuvas, o número de **PFU** obtidas é aumentado. Numa etapa seguinte desse trabalho, para obter a confirmação da presença de profagos inseridos nos genomas dos isolados bacterianos, o ciclo lítico dos fagos será induzido empregando agentes químicos, fármacos (Mitomicina C, antibióticos quinolônicos, penicilinas) e RUV, seguindo de “overlay” com bactérias candidatas a sensíveis à infecção do fago.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, G. M. D. F. **Bacteriófagos e os cem anos de história da fagoterapia no Brasil**7 jun. 2023. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=U8PXv9L4H2k&ab_channel=IBVirtual-UnB>. Acesso em: 7 jan. 2025.

ALMEIDA, G. M. D. F.; SUNDBERG, L.-R. The Forgotten Tale of Brazilian Phage Therapy. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 5, p. e90–e101, maio 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309920300608>. Acesso em: 7 jan. 2025.

CAMPBELL, A. The Future of Bacteriophage Biology. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 6, p. 471–477, jun. 2003. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrg1089>. Acesso em: 21 jan. 2025.

CAPPUCCINO, J. G.; WELSH, C. T. **Microbiology: A Laboratory Manual, Global Edition**. Vivar, Malaysia: Pearson Education Limited, 2018. v. Unico1–560 p.

CHANISHVILI, N. Phage Therapy—History from Twort and d’Herelle Through Soviet Experience to Current Approaches. *Em*: [s.l: s.n.]p. 3–40.

CLOKIE, M. R. J.; MILLARD, A. D.; LETAROV, A. V.; HEAPHY, S. Phages in nature. **Bacteriophage**, v. 1, n. 1, p. 31–45, 22 jan. 2011. Disponível

DOI: 10.51189/iv-ensipex/50888

ISBN: 9786588884546

em:<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/bact.1.1.14942>.

D'HERELLE, F. On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D'Herelle, presented by Mr. Roux. **Research in Microbiology**, v. 158, n. 7, p. 553–554, set. 2007.

DOSS, J.; CULBERTSON, K.; HAHN, D.; CAMACHO, J.; BAREKZI, N. A Review of Phage Therapy against Bacterial Pathogens of Aquatic and Terrestrial Organisms. **Viruses**, v. 9, n. 3, p. 50, 18 mar. 2017. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/9/3/50>. Acesso em: 2 jun. 2024.

DURR, H. A.; LEIPZIG, N. D. Advancements in bacteriophage therapies and delivery for bacterial infection. **Materials Advances**, v. 4, n. 5, p. 1249–1257, 31 jan. 2023.

HARPER, D. R.; ABEDON, S. T.; BURROWES, B. H.; MCCONVILLE, M. L. (ed.). **Bacteriophages: Biology, Technology, Therapy**. Cham: Springer International Publishing, 2021. v. Unico

LIAO, H.; LIU, C.; ZHOU, S.; LIU, C.; ELDRIDGE, D. J.; AI, C.; WILHELM, S. W.; SINGH, B. K.; LIANG, X.; RADOSEVICH, M.; YANG, Q.; TANG, X.; WEI, Z.; FRIMAN, V.-P.; GILLINGS, M.; DELGADO-BAQUERIZO, M.; ZHU, Y. Prophage-encoded antibiotic resistance genes are enriched in human-impacted environments. **Nature Communications**, v. 15, n. 1, p. 8315, 27 set. 2024.

MU, A.; LAWLEY, T. D. Bacteriophage discovery to advance biotechnology and biotherapeutics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 279–279, 17 maio 2023.

RAHMAN, M. ur; WANG, W.; SUN, Q.; SHAH, J. A.; LI, C.; SUN, Y.; LI, Y.; ZHANG, B.; CHEN, W.; WANG, S. Endolysin, a Promising Solution against Antimicrobial Resistance. **Antibiotics**, v. 10, n. 11, p. 1277, 20 out. 2021.

ROUX, M. Sur on an invisible microbe antagonistic to dysentery bacilli. Note by M. F. d'Herelle, presented by M. Roux. Comptes Rendus Academie des Sciences 1917; 165:373–5. **Bacteriophage**, v. 1, n. 1, p. 3–5, 22 jan. 2011.

SAMBROOK, J. R.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual.** New York: Cold Spring Harbor Press, 2001.

SUTCLIFFE, S. G.; SHAMASH, M.; HYNES, A. P.; MAURICE, C. F. Common Oral Medications Lead to Prophage Induction in Bacterial Isolates from the Human Gut. **Viruses**, v. 13, n. 3, p. 455, 11 mar. 2021.

SWENSON, K.; GONZALEZ, J.-P.; STEEN, T. Y. A Way Forward for Phage Therapy in the United States. **Georgetown Medical Review**, v. 8, n. 1, 20 jun. 2024. Disponível em: <https://gmr.scholasticahq.com/article/117696-a-way-forward-for-phage-therapy-in-the-united-states>. Acesso em: 7 jan. 2025.

TURNER, D.; SHKOPOROV, A. N.; LOOD, C.; MILLARD, A. D.; DUTILH, B. E.; ALFENAS-ZERBINI, P.; VAN ZYL, L. J.; AZIZ, R. K.; OKSANEN, H. M.; PORANEN, M. M.; KROPINSKI, A. M.; BARYLSKI, J.; BRISTER, J. R.; CHANISVILI, N.; EDWARDS, R.

DOI: 10.51189/iv-ensipex/50888

ISBN: 9786588884546

A.; ENAULT, F.; GILLIS, A.; KNEZEVIC, P.; KRUPOVIC, M.; KURTBÖKE, I.; KUSHKINA, A.; LAVIGNE, R.; LEHMAN, S.; LOBOCKA, M.; MORARU, C.; MORENO SWITT, A.; MOROZOVA, V.; NAKAVUMA, J.; REYES MUÑOZ, A.; RŪMNIEKS, J.; SARKAR, B.; SULLIVAN, M. B.; UCHIYAMA, J.; WITTMANN, J.; YIGANG, T.; ADRIAENSSENS, E. M. Abolishment of morphology-based taxa and change to binomial species names: 2022 taxonomy update of the ICTV bacterial viruses subcommittee. **Archives of Virology**, v. 168, n. 2, p. 74, 23 fev. 2023.

TWORT, F. W. AN INVESTIGATION ON THE NATURE OF ULTRA-MICROSCOPIC VIRUSES. **The Lancet**, v. 186, n. 4814, p. 1241–1243, dez. 1915. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673601203833>.

VICENTE, E. J.; SIMIONATO, M.R.L; FERREIRA, R.C. **Um protocolo simplificado para isolamento de bacteriófagos bacteriolíticos a partir de amostras de ambientais de rios e lagos urbanos.** Resumo Congresso 32º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA - SBM. Rafain Palace Hotel & Convention, Foz do Iguaçu, PR. 22/10 2023. Disponível em: <https://sbmicrobiologia.org.br/32cbm-anais/resumos/R-1295-1.html>. Acesso em: 15 jan. 2025.

WANG, I.-N.; SMITH, D. L.; YOUNG, R. Holins: The Protein Clocks of Bacteriophage Infections. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 799–825, out. 2000.

YOUNG, R.; BLÄSI, U. Holins: form and function in bacteriophage lysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 17, n. 1–2, p. 191–205, ago. 1995.

ZHOU, S.; LIU, Z.; SONG, J.; CHEN, Y. Disarm The Bacteria: What Temperate Phages Can Do.**Current Issues in MolecularBiology**,v.45 n.2, p.1149–1167,1fev. 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1467-3045/45/2/76>. Acesso em: 21 jan. 2025.

DOI: 10.51189/iv-ensipex/50888