



ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTERÍOFAGOS LÍTICOS COM POTENCIAL DE AÇÃO ANTIMICROBIANA EM BACTÉRIAS PATOGENICAS PRESENTES EM CARNES E PRODUTOS CÁRNEOS

Yasmine Ferrarez Saouda¹, Maria Stella de A. Gonçalves², Thaís Marini³, Miriam Gonçalves Marquezini⁴, Renata Bromberg⁵

Nº 21225

RESUMO - A susceptibilidade de carnes e produtos cárneos à contaminação microbiana está associada a fatores intrínsecos e extrínsecos relacionados a diversos parâmetros, tais como o conteúdo nutricional, o pH, a atividade de água, a temperatura de armazenamento e às práticas tecnológicas e higiênicas adotadas durante o processamento. Assim, perante as condições relacionadas a estes parâmetros, as carnes e os produtos cárneos constituem um dos grupos de alimentos mais frequentemente associados à ocorrência de doenças transmitidas por alimentos. Para reduzir o risco de contaminação microbiana e problemas associados, a indústria de carnes tem buscado alternativas naturais de conservação de seus produtos. O uso de bacteriófagos ou fagos, que são vírus que infectam células de bactérias, representa uma das possibilidades promissoras de biocontrole que podem reduzir a incidência de patógenos bacterianos nos produtos cárneos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar bacteriófagos com atividade inibitória sobre bactérias de importância para carnes e produtos cárneos. Para isso, amostras de diferentes características, tais como água de esgoto, cama aviária, jerked beef e solo, foram usadas para o isolamento de bacteriófagos. Verificou-se a ação antimicrobiana de bacteriófagos contra *Listeria monocytogenes*, o que pode representar um potencial interessante para aplicação futura em produtos cárneos.

Palavras-chaves: Antimicrobianos, Bacteriófagos, Produtos cárneos, Bactérias patogênicas

¹ Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas-SP; yasmine.ferrarez@gmail.com

² Colaborador, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Ciências Biológicas, UNIP, Campinas-SP

³ Colaborador, Assistente de Pesquisa do Instituto de Tecnologia de Alimentos (Ital), Campinas-SP

⁴ Coorientador, Assistente de Pesquisa do Instituto de Tecnologia de Alimentos (Ital), Campinas-SP

⁵ Orientador, Pesquisador do Instituto de Tecnologia de Alimentos (Ital), Campinas-SP



ABSTRACT - *The susceptibility of meat and meat products to microbial contamination is associated with intrinsic and extrinsic factors related to several parameters, such as nutritional content, pH, water activity, storage temperature and technological and hygienic practices adopted during processing. Thus, given the conditions related to these parameters, meat and meat products constitute one of the food groups most frequently associated with the occurrence of foodborne diseases. To reduce the risk of microbial contamination and associated problems, the meat industry has been looking for natural alternatives for preserving its products. The use of bacteriophages or phages, which are viruses that infect bacterial cells, represents one of the promising possibilities for biocontrol that can reduce the incidence of bacterial pathogens in meat products. In this context, the objective of this work was to isolate and characterize bacteriophages with inhibitory activity on bacteria of importance to meat and meat products. For this purpose, samples of different characteristics, such as sewage water, poultry litter, jerked beef and soil, were used to isolate bacteriophages. The antimicrobial action of bacteriophages against *Listeria monocytogenes* was verified, which may represent an interesting potential for future application in meat products.*

Keywords: Antimicrobials, Bacteriophages, Meat Products, Pathogenic Bacteria

1. INTRODUÇÃO

Embora muitos esforços têm sido direcionados para a aplicação de diversas técnicas analíticas e de processamento para garantir a qualidade e a inocuidade dos alimentos, o desenvolvimento de novas abordagens para controlar os agentes microbianos responsáveis tornou-se uma prioridade da indústria de alimentos e de órgão reguladores (BILLINGTON; HUDSON & MCINTYRE, 2010). As carnes e os produtos cárneos incluem-se entre os alimentos que mais preocupam os serviços de saúde pública, em razão dos riscos que apresentam de contaminação por uma grande variedade de bactérias patogênicas. Fatores intrínsecos e extrínsecos relacionados às características e modo de acondicionamento e manipulação destes alimentos, tais como a composição nutricional, o pH, a atividade de água, a temperatura de armazenamento e às práticas higiênicas e tecnológicas adotadas durante o processamento, os tornam altamente suscetíveis à contaminação bacteriana, comprometendo sua segurança e qualidade.



Quando consumidas por meio de alimentos contaminados, algumas cepas bacterianas podem causar doenças intestinais e extraintestinais devido a presença de fatores de virulência que afetam uma ampla gama de processos celulares (KAPER et al., 2004). Dentre as bactérias de importância para carnes e produtos cárneos destacam-se a *Salmonella* sp., e outras patogênicas que afetam a saúde pública, como a *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* O157:H7 (MURRAY, 2000).

Como medida para minimizar o risco de contaminação e o desenvolvimento de microrganismos patogênicos, as indústrias de alimentos buscam alternativas para garantir a segurança do consumidor. Somando-se isso à demanda dos consumidores por produtos mais naturais e saudáveis, em detrimento do uso de conservantes químicos, a adoção de ingredientes naturais na elaboração de produtos cárneos vem se destacando devido ao atual apelo comercial. Desta forma, o uso de bacteriófagos, também conhecidos como fagos, surge como uma técnica promissora para se intensificar a segurança dos alimentos (GREGORACCI, 2006).

O uso dos bacteriófagos na indústria de carnes constitui-se em uma ferramenta que pode auxiliar no controle do crescimento microbiológico. Os bacteriófagos são vírus cujo hospedeiro específico são as bactérias, contra as quais estes têm a capacidade de infectar. A taxonomia desses vírus é baseada em características morfológicas (forma e tamanho) e molecular (DNA ou RNA), sendo que estes são comuns no meio ambiente e presentes em muitos alimentos (DABROWSKA et al., 2005).

De acordo com seu ciclo de replicação, os bacteriófagos podem ser classificados como líticos ou lisogênicos. Os bacteriófagos líticos são os de maior relevância para o controle biológico de bactérias, pois lisam a célula hospedeira a partir da injeção de seu genoma e, a progênie resultante dá continuidade ao ciclo lítico. No caso do ciclo lisogênico, o ácido nucleico do fago se recombina com o da bactéria formando um profago, que se reproduz com a célula hospedeira e confere imunidade contra a infecção pelo mesmo tipo de fago. Eles podem ter hospedeiros altamente específicos, se replicando na presença da bactéria, aumentando seu potencial de biocontrole (KENNEDY et al., 1986).

O mecanismo de biocontrole mediado por bacteriófagos é exercido a partir da escolha de um fago lítico. Este é apropriado para alimentos que podem estar contaminados com patógenos bacterianos e que são suscetíveis a esses bacteriófagos, os quais podem eliminar ou reduzir significativamente a contaminação. O uso de barreiras adicionais em produtos cárneos pode garantir a redução do crescimento de bactérias, tornando-os assim seguros para o consumo (ABULADZE et al., 2008).

Para se aplicar bacteriófagos em alimentos de forma eficiente alguns desafios devem ser superados. A variedade de hospedeiros do fago susceptíveis não deve ser muito restrita, de forma que



este não exerça atividade antibacteriana sobre um número suficientemente grande de cepas hospedeiras (GREER & DILTS, 1990). Além disso, já que a replicação do fago é primordial para que este apresente ação antibacteriana, ela não ocorrerá em temperaturas inferiores a mínima de crescimento do hospedeiro (BILLINGTON & HUDSON, 2005). Embora este fato possa não ser uma preocupação para patógenos como *L. monocytogenes*, que podem crescer em temperaturas de refrigeração, outros patógenos como *E. coli* O157:H7, apresentam temperatura mínima de crescimento de 7°C, que é mais elevada do que aquela na qual os alimentos refrigerados são armazenados. Alguns estudos descreveram o biocontrole de patógenos alimentares por bacteriófagos, incluindo *S. enterica* (BIGWOOD et al., 2008), *L. monocytogenes* (LEVERENTZ et al., 2003), em uma variedade de alimentos.

Desta forma, os bacteriófagos se destacam pela transferência de informação, matéria e energia, além da rápida eliminação bacteriana devido à especificidade de alvo e autorreplicação, propriedades estas que os tornam eficazes para proteção de produtos alimentícios (ROSSI & ALMEIDA, 2010).

Algumas bactérias patogênicas que incidem sobre carnes e produtos cárneos e ocasionam sérios problemas de saúde pública devem ser controladas pela indústria. *Salmonella* sp. e *E. coli* são bactérias Gram-negativas, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, que podem ser potenciais patógenos por provocar infecções quando ingeridas em produtos cárneos contaminados (ANVISA, 2004). Uma das linhagens altamente patogênicas que constitui um importante vetor de doenças transmitidas por alimentos é a *E. coli* O157:H7, pertencente ao grupo das *E. coli* shiga toxigênicas - STEC (GYLES, 2007). A infecção ocasionada por esta bactéria pode ocasionar sérios problemas de saúde ao consumidor como a síndrome hemolítico-urêmica, púrpura trombocitopênica trombótica e colite hemorrágica, afetando principalmente crianças e idosos (GARCIA et al., 2008). Já a *L. monocytogenes* é um bacilo Gram-positivo, que pode se desenvolver em temperaturas de refrigeração. Devido à sua fácil adesão às superfícies, é possível encontrá-la em biofilmes nos equipamentos de processamento de carnes, sendo que algumas linhagens podem se tornar resistentes aos agentes sanitizantes usados pelas indústrias e se desenvolver nos produtos cárneos já tratados termicamente, favorecidas pelo pH pouco ácido, elevada atividade de água e mistura de diferentes tipos de ingredientes (RAMOS, 2009). Também Gram-positivo, o *Staph. aureus* em decorrência de sua capacidade de produzir uma toxina termoestável, que pode resistir às técnicas convencionais de processamento térmico quando presente em produtos cárneos, colocando em risco a saúde do consumidor (BERGDOLL, 1989). Dessa forma, a resistência natural do microrganismo tem estimulado pesquisas para o controle bacteriano mais efetivo.

Tendo em vista as propriedades favoráveis dos produtos cárneos para favorecer o desenvolvimento de microrganismos patogênicos e a necessidade da adoção de métodos que evitem a proliferação dos mesmos, o surgimento de novas alternativas para seu controle, especialmente as



consideradas naturais, como o potencial antimicrobiano de bacteriófagos, pode levar à adoção de medidas efetivas de intervenção nesta categoria de produto. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi isolar, a partir de amostras de diferentes fontes, bacteriófagos líticos específicos contra bactérias patogênicas de importância para carnes e produtos cárneos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Microrganismos e condições de cultivo

As culturas usadas no experimento foram obtidas na coleção de culturas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) pertencente a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) (Tabela 1). As culturas bacterianas foram adquiridas liofilizadas e nas dependências do Laboratório de Microbiologia de Carnes do CTC/Ital foram reativadas e estocadas nas condições descritas por UZUNOVA-DONEVA & DONEV (2005) na Tabela 1.

Tabela 1. Culturas e condições de manutenção e ativação.

Culturas	INCQS	ATCC	Meios de Cultura e Condições	
			Ativação	Estocagem
<i>L. monocytogenes</i>	266	7644	TSB+YE 35°C/24h	TSB + YE + 1,5% Glicerol -82°C
<i>E. coli</i> O157:H7	171	43895	TSB 35°C/24h	TSB + 1,5% Glicerol -82°C
<i>S. enterica</i>	150	14028		
<i>Staph. aureus</i>	358	12600	BHI 35°C/24h	BHI + 1,5% Glicerol -82°C

INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde;

ATCC: American Type Culture Collection;

TSB: Caldo Triptona de Soja;

TSB+YE: Caldo Triptona de Soja suplementado com 0,3% de extrato de leveduras;

BHI: Caldo Infusão Cérebro Coração.

2.2. Isolamento de bacteriófagos líticos para bactérias patogênicas em alimentos

Foi realizado o isolamento de bacteriófagos a partir de amostras de esgoto do Departamento de Água e Esgoto de Campinas (ETE Anhumas), amostras de camas de aviários de granjas locais, do solo e de um produto cárneo, o *jerked beef*.

2.2.1. Isolamento dos bacteriófagos

O isolamento dos bacteriófagos foi realizado segundo o método adaptado de GREGORACCI (2006). Uma porção de aproximadamente 10 g ou ml das amostras foi transferida para bolsas



estéreis, nas quais foram adicionados 300 ml de água estéril, seguindo-se para a etapa de homogeneização em *Stomacher* (Seward Medical Condon SE1 1PP OK, Inglaterra). Em seguida, 100 ml das amostras foram transferidos para tubos tipo Falcon, nos quais foram adicionados 1,45 g de NaCl. Os tubos foram centrifugados a 7.500 rpm por 15 min e os sobrenadantes foram transferidos para um tubo Falcon estéril. Em cada tubo foi adicionado Tween 80 até atingir a concentração final de 10% (m/v) e, em seguida, estes foram homogeneizados em vortex e armazenados sob refrigeração ($4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) por 24 h. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 7.500 rpm por 20 min e o sobrenadante foi descartado. O precipitado resultante foi ressuscitado em 10 ml de tampão de diluição de fago SM (20 mg/l Tris HCl, 10 mg/l MgSO_4 , 10 mg/l CaCl_2 , 100 mg/l NaCl, pH 7,5, SAMBROOK & RUSSELL, 2001) e extraído uma vez, com o mesmo volume de clorofórmio. O clorofórmio e os sedimentos celulares bacterianos foram removidos por decantação a $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e centrifugação a 3.000 rpm por 10 min. O concentrado de bacteriófagos foi filtrado em filtro de seringa de 0,45 μm e foi mantido a $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ até o momento do uso.

A partir das culturas bacterianas ativas (Tabela 1) foi transferida uma alíquota de 0,2 ml de cada cultura para um tubo de ensaio estéril e, em seguida foi adicionada uma alíquota de 0,3 ml da solução contendo o bacteriófago. O teste foi realizado individualmente para cada solução de bacteriófago proveniente de uma amostra e para cada cultura de microrganismo. Como controle positivo foi transferida uma alíquota de 0,2 ml do microrganismo alvo para um tubo de ensaio e, em seguida adicionada uma alíquota de 0,3 ml de água deionizada. Os tubos foram homogeneizados em vortex e incubados a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 1 h. Em cada tubo de ensaio foi adicionado 3 ml de meio de cultura semissólido (0,7% de ágar), de acordo a Tabela 1, previamente fundido a 50°C . Os tubos foram agitados manualmente de maneira cuidadosa para evitar a formação de bolhas de ar. O conteúdo de cada tubo de ensaio foi distribuído na superfície de uma placa de Petri contendo meio de cultura, conforme preconizado na Tabela 1. Após a solidificação do meio de cultura, as placas foram incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 h. A avaliação da presença de placas de lise (zonas claras dentro da camada de crescimento bacteriano), que indicaram as áreas de ocorrência de infecção e lise celular em cada amostra, foram visualizadas com o auxílio de um contador de colônia.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

No presente trabalho, dois bacteriófagos foram isolados a partir de solo os quais apresentaram atividade lítica com a formação de halos de inibição contra *L. monocytogenes*. Não foram isolados bacteriófagos a partir das amostras de cama de aviário, de *jerked beef* e de esgoto, fato comprovado pela ausência de atividade lítica frente às bactérias testadas. Este resultado pode



indicar a ausência ou a baixa concentração de bacteriófagos nestas amostras. Alguns autores obtiveram sucesso no isolamento de bacteriófagos a partir de amostras de esgoto. GREGORACCI (2006) descreve o isolamento de bacteriófagos com potencial lítico contra *S. enterica*, *E. coli*, entre outras bactérias, mas não obtiveram sucesso no isolamento de bacteriófagos com ação inibitória contra *Staph. aureus*. BILLINGTON *et al.* (2013), por sua vez, conseguiram isolar bacteriófagos com ação infectante sobre *E. coli* O157:H7 e comprovaram sua capacidade inibitória *in vitro* e em carne bovina.

A tentativa do isolamento de bacteriófagos líticos a partir das amostras testadas, de esgoto, *jerked beef*, cama de aviário e solo, não resultou na obtenção de um número significativo de isolados com ação inibitória sobre as bactérias avaliadas, o que pode ter ocorrido devido a concentração reduzida de bacteriófagos presentes nas amostras. Seria importante dar continuidade a esta pesquisa, testando outras técnicas de concentração de bacteriófagos, além de avaliar amostras de diferentes fontes, para que outros patógenos de interesse para a indústria de carnes possam ser controlados de maneira mais efetiva com o uso do biocontrole exercido por bacteriófagos. Desta forma, poderiam ser ampliadas as informações sobre a diversidade de ambientes em que os bacteriófagos podem ser encontrados, assim como de suas características de sobrevivência, para sua aplicação efetiva na indústria de alimentos, especificamente, de carnes. Por fim, sugere-se a realização de estudos posteriores sobre a aplicação destes bacteriófagos, para dimensionar o potencial antimicrobiano destes dois isolados contra *L. monocytogenes* em produtos cárneos e ambiente de planta de processamento destes produtos.

4. CONCLUSÃO

Foram isolados dois bacteriófagos com potencial inibitório sobre *L. monocytogenes* a partir de uma amostra de solo. Não houve formação de halos de inibição para as outras linhagens de bactérias nas demais amostras avaliadas (*jerked beef*, esgoto e cama de aviário).

5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq pela bolsa concedida.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABULADZE, T. Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli, and ground beef by *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 6230-8, 2008.



BERGDOLL, M. S. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M. P. (Ed.) **Foodborne Bacterial Pathogens**. New York: Marcel Dekker, 1989. cap.11, p. 463-523, 1989.

BILLINGTON, C. C., HUDSON, J. A. Chilling Out? Phage replication in *Salmonella* incubated at suboptimal temperatures. In: 16th EVERGREEN INTERNATIONAL PHAGE BIOLOGY MEETING, 2005, Olympia, WA, USA. Anais...2005.

BILLINGTON, C.; HUDSON, J. A.; MCINTYRE, L. 2010. Application of bacteriophages to control pathogenic and spoilage bacteria in food processing and distribution. In: SABOUR, P. M., GRIFFITHS, M. W. (Eds.), **Bacteriophages in the control of food- and water-borne pathogens**. ASM Press, Washington, DC, p. 119 e 135.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Principais síndromes infecciosas**. Brasil 2004. Disponível em: https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_1_2004.pdf. Acesso em 24 jun 2021.

DABROWSKA, K. et al. Bacteriophage penetration in vertebrates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 7-13, 2005.

GARCIA, P. M.; ARCURI, E. F.; BRITO, M. A. V. P.; LANGE, C. C.; BRITO, J. R. F.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; GARCIA, P. M. Detecção de *Escherichia coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de leite cru por método convencional e PCR multiplex. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, p.1241-1249, 2008.

GREGORACCI, G. B. **Levantamento de bacteriófagos líticos: isolamento e caracterização de vírus provenientes de esgoto comum com potencial aplicação antimicrobiana**. 2006. Tese (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, SP.

GREER, G. G.; DILTS, B. D. Inability of a bacteriophage pool to control beef spoilage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 10, p. 331-342, 1990.

GYLES, C. L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 45-62. 2007.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Review Microbiology**. 2004. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrmicro818>>. Acesso em: 19 jan 2021.

KENNEDY, J. E., WEI, C. I., OBLINGER, J. L. Distribution of coliphages in various foods. **Journal of Food Protection**, v. 49, p. 944-951, 1986.

MURRAY, P. R. **Microbiologia médica**, 3.ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2000. 726p.

RAMOS, L. P. **Listeria monocytogenes em linguças do tipo fresco vendidas a varejo no município de Salvador - BA e eficácia do bacteriófago P100 no controle da contaminação pelo patógeno**. 2009. 105 f. Tese (Mestrado) - Universidade Federal da Bahia, BA.

ROSSI, L. P. R.; ALMEIDA, R. C. C. Bacteriófagos para controle de bactérias patogênicas em alimentos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, p. 151-156, 2010.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: A laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

UZUNOVA-DONEVA, T.; DONEV, T. Anabiosis and conservation of microorganisms. **Journal of Culture Collections**, v. 4, p. 17-28, 2005.

Revisão ortográfica

A responsabilidade pela revisão ortográfica do resumo expandido é dos autores.