

# CONTROLE BACTERIANO DE EFLUENTES

Controle biológico bacteriano e tratamento de efluentes através do uso de bacteriófagos

## Mariana Roberta dos Reis

Faculdade de Tecnologia de Sorocaba, FATEC, Sorocaba; Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP [marianarreis@aol.com](mailto:marianarreis@aol.com)

## Elisabeth Pelosi Teixeira

Dra. Departamento de Saúde Faculdade de Tecnologia de Sorocaba, FATEC [epelosi@uol.com.br](mailto:epelosi@uol.com.br)

## Wanderley Dias da Silveira

Pb.D. Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas. [uds@unicamp.br](mailto:uds@unicamp.br)

Ilustrações cedidas pelos autores

## Introdução

O aumento populacional, juntamente com o crescimento desordenado das cidades, tem levado, paulatinamente, ao desgaste qualitativo e ao consumo irreversível das fontes de abastecimento, incluindo, aqui, as fontes aquíferas para consumo, uso doméstico e agricultura. O esgoto urbano bruto é resultante dos despejos domésticos e industriais, o qual lançado num manancial contribui para sua degradação, afetando sua qualidade (JORDÃO *et al.*, 1995).

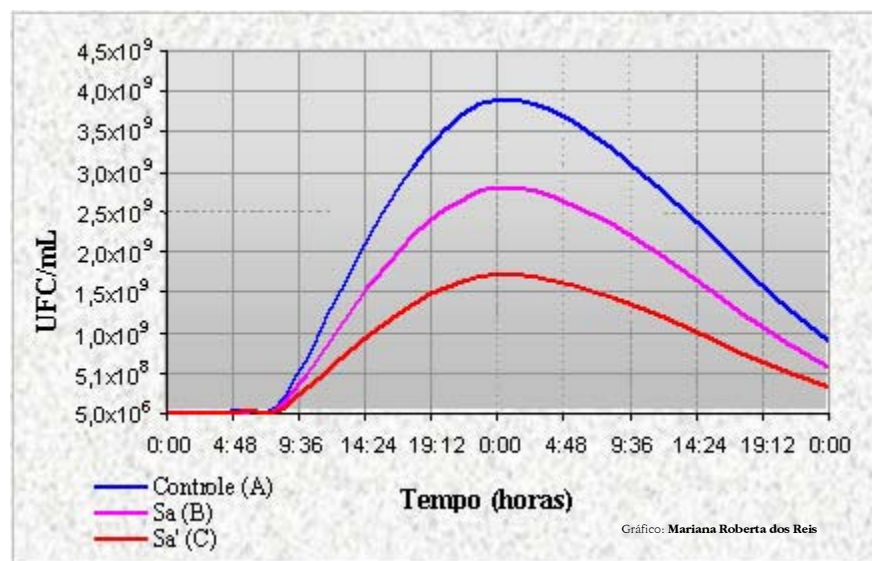
Assim, com a finalidade de poupar as fontes naturais, a água já utilizada por seres humanos para consumo próprio, ou outras finalidades, deve passar por processos de tratamento

que permitam a sua reutilização segura sem causar processos de morbidade à saúde e/ou mortalidade.

A implantação de uma estação de tratamento de efluentes (ETE) tem por objetivo reduzir a carga contaminante ou poluente das águas residuárias, de modo que o efluente final tratado possa retornar para o corpo d'água, sem provocar a degradação do meio e não causar riscos à saúde do homem (BORSOI *et al.*, 2002; Von SPERLING, 1996).

O presente trabalho relata o uso de bacteriófagos (fagos líticos), vírus que lisam bactérias, como método para a redução de número de unidades formadoras de colônias (UFC) de bactérias potencialmente patogênicas para os seres humanos e presentes em estações de tratamento de esgotos (ETE), com o objetivo de minimizar possíveis processos de morbi-mortalidade causadas por essas mesmas bactérias quando da utilização da água para consumo.

A principal vantagem de utilizar fagos líticos como controle bacteriológico, e ferramenta complementar em tratamento de efluentes nas ETEs reside na propriedade que eles possuem de se replicarem apenas na presença de seu hospedeiro específico, levando à lise celular bacteriana com produção de novos fagos, os quais mantêm seu ciclo de lise enquanto existirem células bacterianas disponíveis para sua replicação, o que deverá, teoricamente, levar a uma diminuição progressiva dos possíveis contaminantes bacterianos presentes as ETEs (DAVIS *et al.*, 1973). Por outro lado, os mesmos fagos podem estar presentes den-



**Figura 1:** Curva de avaliação de morte celular bacteriana de *Staphylococcus aureus* (Sa), determinada através da contagem de UFC. A: Curva controle contendo apenas Sa. B: Curva Sa contendo fago não mutante. C: Curva Sa' contendo fago mutante lítico obrigatório. Os dados são médias de 2 repetições  $\pm$  desvio padrão da média.

tro do genoma de sua célula hospedeira, em estado quiescente ou profágico, e não levar à lise celular dele. Por esse motivo, a obtenção e utilização de fagos mutantes que realizem apenas o ciclo lítico para posterior utilização nas ETes é um objetivo que deve ser alcançado.

Como dentro dos resíduos das ETes existem milhares de espécies bacterianas diferentes, muitas das quais potencialmente contendo um ou mais fagos específicos, este trabalho teve por objetivo selecionar fagos que pudessem ser utilizados para o objetivo acima e dentre esses, selecionar um para a obtenção de mutante que obrigatoriamente realizasse apenas o ciclo lítico.

## Metodologia e resultados

### Seleção de fagos

Para essa finalidade, suspensões contendo material bruto de diferentes ETes (industriais, hospitalares e municipais) foram coletados em condições de assepsia, filtradas em membranas Millipore de 0,2µm e o sobrenadante resultante mantido em condições de refrigeração (4°C). Um volume de 200µL dessas suspensões foi, a seguir, adicionadas a culturas bacterianas líquidas purificadas (*Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*) e mantidas em cultivo (37°C) por 12 horas. A seguir, os meios foram centrifugados e os sobrenadantes armazenados entre 4°C e 8°C, após filtração. A confirmação de fagos específicos na cultura de cada uma das bactérias foi realizada através do mesmo procedimento observando-se agora, ou o não crescimento bacteriano, ou a diminuição da turbidez do meio de cultura líquido. A obtenção de fagos purificados específicos foi realizada através da metodologia descrita por DAVIS *et al.*, 1973 e a observação do sobrenadante líquido através de microscopia eletrônica (PALMER, 1988). Posteriormente, cada fago isolado em uma determinada cultura bacteriana foi testado contra as demais culturas para confirmar a sua especificidade.

### Obtenção de fago lítico mutante obrigatório

Para isto, uma suspensão bacteriana contendo *Staphylococcus aureus*, com um bacteriófago em seu interior, foi submetida ao tratamento com luz ultravioleta (260nm) (5% de sobrevivência de UFC/mL) e o sobrenadante obtido, após filtração, novamente testado contra essa cultura bacteriana, usando-se como controle uma cultura contendo essa bactéria e a suspensão do fago não-lítico obrigatório. A seguir, após nova filtração, o sobrenadante (300µL) foi adicionado a 200µL da cultura bacteriana receptora e a mistura adicionada a 4mL de meio LA semi-sólido e, então, incubada a 37°C por 30min, para haver a interação do fago com a célula bacteriana. Esta suspensão final foi, então, adicionada sobre uma placa contendo 15mL de meio LA (conforme metodologia descrita por SAMBROOK *et al.*, 1989, com modificações). Após incubar a 37°C durante a noite uma placa de lise (a que apresentou halo o mais translúcido possível) foi retirada do ágar e adicionada a uma cultura bacteriana em fase exponencial de crescimento. Após cultivo (37°C) por 12 horas e centrifugação (12.000rpm), o sobrenadante foi novamente filtrado e mantido em estoque a 4°C.

### Utilização do fago lítico mutante obrigatório no controle de células bacterianas específicas

Suspensões fágicas, não mutante e mutante, obtidas como descrito anteriormente, foram, separadamente, adicionadas em culturas contendo *Staphylococcus aureus* (1:1000) em fase exponencial de crescimento ( $5 \times 10^6$  UFC/mL) e alíquotas (100µL) retiradas, diluídas sequencialmente, na razão 1:10, e semeadas em placas de Petri contendo meio LA. Após crescimento (37°C, 12h) as UFC/mL foram determinadas.

## Resultados e discussão

Assim, como há preocupação no sentido de tornar pura a água captada em rios, fontes ou poços, antes de servi-la à população, também há preocupação quanto ao destino dos esgotos sanitários, sabendo-se que o des-

pejo “*in natura*”, nos rios, tem consequências danosas à saúde das populações, ocorrendo, não raras vezes, uma relação entre manifestações de doenças de transmissão fecal-oral e a existência de focos de contaminação. Tal situação, porém, pode ser minimizada com o tratamento de esgotos sanitários.

Há várias opções disponíveis para tratamento de efluentes, que devem ser avaliadas segundo critérios de viabilidade técnica e econômica, além de adequação às características topográficas e ambientais da região. Dependendo das necessidades locais, o tratamento pode se resumir aos estágios preliminar, primário e secundário (COSTA, 2004).

No entanto, quando o lançamento dos efluentes tratados se der em corpos d'água importantes para a população, seja porque deles se capta a água para o consumo, seja porque são espaços de lazer, recomenda-se também o tratamento terciário caracterizados pelo uso de hipoclorito de sódio, ozonização, luz ultravioleta, etc. (LINSLEY *et al.*, 1992).

A abundância e a importância ecológica dos vírus nos meios aquáticos têm sido atestadas com o aumento do número de estudos voltados para eles. Segundo TEDIASHVILI *et al.*, 2003, os fagos apresentam um papel importante no controle da densidade e diversidade da população bacteriana no meio. Eles também são considerados indicadores naturais da população microbiológica do efluente.

Neste trabalho, procuramos obter fagos que pudessem ser utilizados como tratamento complementar, aos já disponíveis, para a diminuição do número de bactérias potencialmente patogênicas presentes em ETes. Para isso, a primeira etapa foi a obtenção de bacteriófagos a partir da água de diferentes ETes sendo obtidos fagos com capacidade de lise de todas as amostras bacterianas estudadas, a maioria dos quais com especificidade para uma determinada bactéria utilizada como hospedeiro. A exceção a esse comportamento foi um bacteriófago, isolado em *Shigella flexneri*, que também apresentou capacidade de lise de *Shigella sonnei* e *Escherichia coli*.

Existem muitos estudos com efei-



tos da luz UV em diferentes microrganismos (ANGEHRN, 1984; MASSCHELEIN, 2002; OPPENHEIMER *et al.*, 1993). Lâmpadas UV emitem radiação num comprimento de onda entre 240-260nm, comprimento de onda no qual o ácido nucléico absorve a energia (ANGEHRN, 1984). A luz UV causa mutação através da formação de dímeros de pirimidinas nas bases nitrogenadas existentes ao longo da cadeia de DNA (MASSCHELEIN, 2002). Assim, o uso dessa luz pode causar mutação nos genes responsáveis pela manutenção adequada do vírus no estado de profago e liberar vírus que possuam apenas a capacidade lítica.

Dessa maneira, entre todos os fagos específicos que foram isolados, e com a finalidade de simplificar os resultados obtidos, utilizamos aqueles originários de *Staphylococcus aureus* para a irradiação com luz UV e obtenção de fagos líticos obrigatórios.

Verificou-se que, após irradiação para a determinação da dose letal que levava à sobrevivência de 5% das UFC/mL ( $7,75 \times 10^5$  UFC/mL), um elevado número de placas de lise em cultura sensível (*Staphylococcus aureus*).

No teste realizado “*in vivo*”, os fagos mutantes líticos obrigatórios de *Staphylococcus aureus* foram utilizados, sendo obtida uma diminuição do número de UFC/mL de 55,4% do crescimento bacteriano, em relação ao controle A utilizado.

Uma diminuição maior do número de UFC/mL pode não ter sido obtida devido à provável existência da presença de bacteriófagos integrados ao genoma de uma parcela da população da bactéria hospedeira, *Staphylococcus aureus*, o que torna essas bactérias imunes à lise fágica (LEWIN, 1987). Isso, porém, não inviabiliza nossos resultados, pois diferentes tipos de fagos líticos obrigatórios, específicos para a bactéria hospedeira, podem ser selecionados e utilizados com o propósito de provocar o aumento da lise bacteriana, minimizando, assim, a possível presença de fagos em estado profágico.

Nosso trabalho demonstra que fagos líticos obrigatórios podem ser obtidos a partir de fagos não mutantes, pré-existent, como já descrito na

literatura (NAKASHIMA *et al.*, 1998) e que o uso deles em uma cultura celular “*in vivo*” pode levar a uma diminuição no número de unidades formadoras de colônias e, conseqüentemente, diminuição do número de bactérias patogênicas presentes em uma determinada ETE.

Dessa maneira, sugerimos que o uso de fagos líticos específicos pode ser obtido para qualquer tipo bacteriano, inclusive aqueles patogênicos presentes no esgoto bruto, e que o uso deles pode ser utilizado de maneira complementar àqueles já preconizados em estações de tratamento de águas residuais. Outrossim, suspensões contendo diferentes fagos, para diferentes espécies bacterianas, poderiam ser utilizados para tal finalidade, levando a uma diminuição global de prováveis patógenos.

### Conclusão

Os resultados aqui obtidos demonstram que o isolamento de fagos específicos pode ser realizado a partir de fagos presentes em águas residuais obtidas a partir de estações de tratamento de esgotos.

A partir destes isolados de fagos podem ser obtidos fagos líticos obrigatórios, de maneira prática, rápida e de baixo custo.

Os fagos líticos podem ser utilizados de maneira complementar aos métodos já existentes para a diminuição do número de bactérias patogênicas presentes em uma determinada estação de tratamento, o que torna esse tratamento mais eficiente e, portanto, a água a ser liberada dela com menor potencial patogênico.

### Referências Bibliográficas

- ANGEHRN, M. Ultraviolet disinfection of water. *Aqua*, 1984, n.2, p. 109-115.
- BORSOI, Z.; CAMISÃO, M. L.; LANARI, N.; TORRES, S.; GOMES, S. M. Tratamento de Esgoto: Tecnologias Acessíveis. **Informe infra-estrutura, Área de projetos de infra-estrutura**, n.16, nov. 1997.
- COSTA, A. J. F. Saneamento ambiental. Disponível em: <<http://federativo.bndes.gov.br/dicas/>

- D 1 2 1 % 2 0 - %20Saneamento%20ambiental .htm>. Acesso em: 16 jun. 2004.
- DAVIS, B. D.; DULBECCO, R.; EISEN, H. S.; GINSBERG, H. S.; JR WOOD, W. B. Microbiologia. São Paulo: EDART, 1973. 4v. V.4: Virologia.
- JORDÃO, E. P.; PÊSSOA, C. A. Tratamento de Esgoto Doméstico. 3ªed. Rio de Janeiro: ABES, 1995.
- LEWIN, B. Genes. 3.ed. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1987. p. 269-291.
- LINSLEY, R.K.; FRANZINI, J.B. Engenharia de recursos hídricos. São Paulo: McGraw-Hill, 1978. 798p
- MASSCHELEIN, W. J. Ultraviolet light in water and wastewater sanitation. Boca Raton: Lewis Publishers, 2002.
- NAKASHIMA, Y.; HASUWA, H.; KAKITA, Y.; MURATA, K.; KUROIWA, A.; MIAKE, F.; WATANABE, K. A temperate phage with cohesive ends induced by mitomycin C treatment of *Lactobacillus casei*. **Archives of Virology**, v.143, p. 1621-1626, 1998.
- OPPENHEIMER, J. A.; LAÏNÉ, J.-M.; JACANGELO, J. G.; BHAMRAH, A.; HOAGLAND, J. E. Chlorine and UV disinfection of tertiary effluent: a comparative study of bacterial and viral inactivation and effluent by-products. Proceedings of the 66th Annual Conference, Water Environment Federation, Anaheim, CA, 1993. p. 557-568.
- PALMER, E.L.; MARTIN, M.L. Electron Microscopy in Viral Diagnosis. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc, 1988. p. 77. 194 p.
- SAMBROOK, J.; FRITSH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual; (Appendix A) Bacterial Media, Antibiotics, and Bacterial Strains. 2.ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 3v. V.3.
- TEDIASHVILI, M.; CHANISHVILI, N. Experience and prospects of the use of bacteriophage in environmental studies. In: International Workshop, nov. 2003. Anais da Wastewater hygienisation in constructed wetlands, ponds and related systems, nov. 2003. p. 25. 45p.
- Von SPERLING, M. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. V.1. Belo Horizonte: UFMG, 1996. 240p.