



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

Paula Rogovski

**Isolamento, caracterização e aplicação de bacteriófago lítico (SM1) como
biocontrolador de *Salmonella* em cama de aviário**

Florianópolis
2021

Paula Rogovski

Isolamento, caracterização e aplicação de bacteriófago lítico (SM1) como biocontrolador de *Salmonella* em cama de aviário

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

Orientadora: Profa. Dra. Gislaine Fongaro
Coorientador: Dr. David Lázaro-Rodríguez

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra

Rogovski, Paula

Isolamento, caracterização e aplicação de bacteriófago lítico (SM1) como biocontrolador de Salmonella em cama de aviário / Paula Rogovski ; orientadora, Gislaine Fongaro, coorientador, David Rodríguez-Lázaro, 2021.

62 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Biocontrole. 3. Bacteriófagos. 4. Virologia ambiental. I. Fongaro, Gislaine. II. Rodríguez-Lázaro, David. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

Paula Rogovski

Isolamento, caracterização e aplicação de bacteriófago lítico (SM1) como biocontrolador de *Salmonella* em cama de aviário

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Professora Dra. Simone Ulrich Picoli
Universidade Feevale

Professora Dra. Maria Tereza Pepe Razzolini
Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo

Dr Airton Kunz
Embrapa Suínos e Aves, Concórdia
(Membro suplente)

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em biotecnologia e biociências.

Professor Dr. Glauber Wagner
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Professora Dra. Gislaine Fongaro
Orientadora

Florianópolis, 2021.

Este trabalho é dedicado aos meus amados pais e amigos.

AGRADECIMENTOS

É com imensa felicidade que de forma singela venho agradecer a todos os eventos que guiaram minha trajetória até o presente momento, pois o universo com sua grandiosidade e sabedoria me proporcionou uma vida repleta de pessoas e oportunidades especiais. Início agradecendo às parcerias, pois sem elas este trabalho não seria possível, obrigada ao Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos, UFFS, Erechim, especialmente à Dr. Helen Treichel. Obrigada à Universidade do Contestado (PMPECSA), principalmente à Dr. Aline Viancelli, a Embrapa Suínos e Aves e a querida Deisi Tápparo. Agradeço enormemente à CAPES pelo fornecimento de minha bolsa e demais financiamentos que possibilitaram a realização deste estudo.

Obrigada à minha família de forma geral por todo amor, carinho e cuidado ao longo deste período. Gostaria de agradecer especialmente aos meus avós, e seus antecessores, por todos os caminhos percorridos para que tantas portas pudessem se abrir para mim. Agradeço enormemente meus pais, por todas as energias investidas em mim, por sempre terem apoiado minhas decisões e estarem presentes no plantio de cada sonho. Querido pai, obrigada pelas asas, mas também pelas raízes, principalmente pelos colos e choros ao telefone. Amada mãe, não poderia haver melhor exemplo no mundo de uma mulher forte e determinada como você. Obrigada por me ajudar a escolher minhas batalhas, por todo amor, dedicação e por ter sempre incentivado meu amor pela leitura e as artes. Bruna e Beatriz, obrigada por trazerem mais alegria, amor e conhecimentos para nossos dias.

Dedico meu agradecimento especial à minha orientadora Dra. Gislaine Fongaro, pois sem você nem uma letra deste documento seria redigida. Querida Gis, muito obrigada por abrir as portas do LVA e me acolher, muito mais do que me aceitar como orientanda. Serei eternamente grata a todas as oportunidades que sempre me ofereceu, e por apoiar ideias, minicursos e cursos com meus queridos colegas de laboratório. Obrigada por ser a “mãe” da amada família LVA, por cada aula, palestra e ensinamento, por todo seu cuidado conosco. Obrigada por ser esse exemplo de garra, de pesquisadora dedicada que ama o que faz, lhe admiro enormemente.

Não posso deixar de agradecer muitíssimo a família LVA!!! É um prazer aprender ao lado de vocês, pessoas tão queridas e acolhedoras. Obrigada primeiramente à nossas orientadoras Dra. Gislaine Fongaro, Dra. Izabella Thaís da Silva e Dra. Ariadne Cristiane Cabral da Cruz, que possibilitam a realização de muitos sonhos através das oportunidades que nos proporcionam. Doris, muito obrigada pelos exemplos, por me ajudar a me acalmar e segurar

as pontas, e também pelos chás e *Ora pro nobis*. Isa, obrigada por me ensinar tanto, por ser paciente (mesmo quando eu estava fazendo barulho e/ou semelhantes), e por ser um exemplo de organização. Bea, muito obrigada por ser essa amiga tão maravilhosa, mãe de planta rolezeira que faz seu trabalho de maneira tão bela e responsável. Querida Cati, agradeço por toda troca de conhecimentos, experiências e principalmente receitas! Afinal é o que mais tem nas nossas conversas... obrigada pelo ombro amigo em qualquer momento.

Rapha, obrigada pela parceria, por tantos aprendizados compartilhados ao longo da jornada fágica, valeu por ser um ouvinte incentivador. Tevinho, muito obrigada por todas as risadas, admiro muito a sua dedicação e perseverança, tanto quanto sua sede pelo conhecimento científico. Também quero agradecer aos colegas de corredor, o pessoal do laboratório de Protozoologia e da Bioinformática, principalmente os colegas Adriana, Bibiana, Laryssa, Eric, Tati e Guilherme. Obrigada pelos reagentes, materiais e equipamentos compartilhados, mas principalmente pelos cafezinhos e abraços que ajudaram a dar aquela energia para seguir o dia.

O que falar de meu colega/amigo/parceiro/mon amour Rafa?? Sempre tive certeza de que encontraria pessoas com quem me daria bem aqui, mas de forma alguma poderia imaginar ter uma amizade tão sincera e bela como a sua. Love, obrigada por tudo, tudo, tudinho. Por cada ida ao Subway, cada limpeza da cultura, autoclavação e principalmente todas as reflexões compartilhadas. Te admiro muitíssimo, e sou enormemente grata por toda a parceria, cada momento com a sua companhia, no laboratório ou fora dele. No mercado, andando de bike ou tocando violão, obrigada por sempre me incentivar a ser uma pessoa melhor, sincera com meus sentimentos. Que seja sempre assim, essa simbiose, que mesmo de longe estamos perto. Te amo!!!!

Querida amiga Bi, muitíssimo obrigada por dividirmos muito mais do que um apartamento, obrigada por termos formado um lar, um lugar acolhedor onde nossas dores e felicidades podem ser compartilhadas, validadas. Valeu por todos os rolês, as inúmeras caronas e praias, todas as vezes que me incentivou em qualquer que fosse a atividade que eu estava realizando. Obrigada pela sintonia e pela parceria, pelos rangos deliciosos e pela confiança e confidências. Por mais que existam sentimentos para os quais as palavras ainda não foram inventadas, hoje vou me limitar as que já estão presentes em nosso dicionário, mas quero que saiba que te amo, te admiro e nutro um carinho sem tamanho por tudo que vivemos.

Minhas amadas Marina e Ana Cristina, obrigada por tanto. Ma, obrigada por me trazer para a praia, como um dia juntas sonhamos. Mais do que isso, obrigada por me acolher nessa cidade nova, por me apresentar lugares, pessoas, a aquarela e por toda troca de conhecimentos,

sentimentos e experiências. Ana, obrigada pelos colos! De tantas coisas que tenho para lhe agradecer, as trocas de vivências e aprendizados pela auto-observação são as mais especiais. Muito obrigada por tanto amor meninas. Muito obrigada à Isa, minha amiga ukuleleira e trilheira pelas boas risadas e ótimas indicações literárias. Agradeço ainda, à minha querida psicóloga Reneé por me guiar na jornada do autoconhecimento. Obrigada por me ensinar a não fazer nada, a ser mais leve e carinhosa comigo mesma.

Também quero agradecer tantas pessoas que entraram em minha vida neste período, e agora, presentes muito mais na forma virtual, contribuem para que eu seja essa pessoa feliz e grata pelos seres amados que me cercam. Maitê, Rodrigo, Gabe, Fábio, Charli e Yuri. Obrigada a meus amigos de Concórdia, Pile, Alves, Indi, André, e de Santa Maria, Amanda, Clau, Luli, Nathi, Luiza e Vini. Mesmo de longe nossos laços se mantêm, e espero poder estreitá-los sempre que possível com um abraço apertado. Por fim, gostaria de agradecer a mim mesma por saber que desistir não é uma opção, principalmente de mim e das coisas que acredito. Também sou grata pela auto dedicação, disciplina e pela falta dela às vezes.

É provavelmente muito cômodo esperar que um grande Zelador do Ecossistema venha à Terra e corrija nossos abusos ambientais. Cabe a nós a tarefa.... Já é hora de sabermos também (SEGAN, Carl, 1997)

RESUMO

Mais de 70% das doenças emergentes e reemergentes são zoonóticas. O gênero *Salmonella* deve ser destacado, sendo causador de impactos na saúde humana e animal, em especial na produção de aves e na economia do do Brasil, como um dos principais exportadores de tal fonte proteica animal. Desde a descoberta dos bacteriófagos, estes têm sido aplicados com sucesso no controle bacteriano, apresentando-se como alternativas para o controle de *Salmonella* em áreas de produção de aves. Desta forma, o presente trabalho visou controlar contaminações de *Salmonella enterica* Enteritidis em camas de aviário com o uso de um bacteriófago isolado de dejetos suínica da pecuária brasileira. Amostras de dejetos de suínos distribuídas na cidade de Concórdia, na Região Oeste de Santa Catarina, Brasil, foram usadas para o isolamento de bacteriófagos líticos, utilizando a técnica de placa de duplo-ágar, quantificando-o em unidades formadoras de placa (UFP). O bacteriófago SM1 (“Swine manure”), pertencente à Ordem Caudovirales e Família Siphoviridae, foi obtido e propagado, demonstrando capacidade lítico em até 3 h de cultivo frente à *S. Enteritidis* e *S. enterica* Typhimurium em cultivo *in vitro*. Para avaliar a capacidade do bacteriófago SM1 reduzir *Salmonella* em camas de aviárias, dois conjuntos experimentais foram executados: No primeiro, avaliou-se a estabilidade do bacteriófago SM1 (concentração $1,8 \times 10^6$ UFP mL⁻¹) em camas de aviários em função do tempo de exposição (dias), por até 35 dias, pensando-se em um ciclo de produção de aves, do alojamento até preparação para o abate. Tais camas eram oriundas de 1, 3, 6 e 9 lotes de produção, sendo todas estas alcalinizadas à campo em escala real com adição de 10% de calcário. Ainda, camas de 9 lotes de produção (prontas para serem removidas dos galpões de criação), foram suplementadas com aditivo de 10% de cascas de ovos (v/v), para fins de secagem e valoração como biofertilizantes. No segundo conjunto experimental, camas de aviários com 6 lotes de ciclos de produção foram contaminadas artificialmente com $2,5 \times 10^5$ UFC mL⁻¹ de *S. Enteritidis* e tratada com bacteriófago SM1, nas quais o primeiro tratamento (T1) foi realizado aplicando-se por gotejamento $1,8 \times 10^6$ UFP mL⁻¹ do bacteriófago SM1, sendo a redução de *S. Enteritidis* avaliada por até 12h; no segundo tratamento (T2) duas doses subsequentes de SM1 foram administradas por gotejamento às 6h e 12h após T1. Os resultados dos dois conjuntos experimentais, demonstraram que o bacteriófago SM1 manteve-se estável, sem apresentar tendência de decaimento nas camas de aviários testadas. Ainda, houve redução efetiva, em relação ao controle não tratado com o bacteriófago, de 3Log₁₀ UFC/g de *S. Enteritidis* após 6h após sua administração no T1. No entanto, observou-se recrescimento bacteriano de 1,5 Log UFC/g 8h após tal administração, evidenciando a necessidade de segunda aplicação do bacteriófago. Após a segunda administração, o T2 foi capaz de controlar 3Log₁₀

UFC/g de *S. Enteritidis*, em relação ao controle não tratado com tal biocontrolador, sem observação de recrescimento bacteriano e total eliminação da carga bacteriana testada. Este estudo destaca a eficiência do bacteriófago SM1 no controle de *S. Enteritidis* em camas de aviários, podendo este ser explorado para outras matrizes ambientais. Também se ressalta a necessidade de escalonamento experimental e testagem de diferentes doses bacteriofágicas para fins de controle absoluto de *Salmonella* na atividade de produção avícola, assegurando a ausência de recrescimento bacteriano e qualidade sanitária de camas de aviários a serem recicladas para biofertilização.

Palavras-chave: controle microbiológico; isolamento viral; matriz ambiental.

ABSTRACT

More than 70% of emerging and reemerging diseases are zoonotic. The genus *Salmonella* should be highlighted, causing impacts on poultry production and on the economy related to such activity. Since the discovery of bacteriophages, they have been successfully applied in bacterial control, presenting themselves as alternatives for the control of *Salmonella* in areas of poultry production. Thus, the present work aimed to control contamination of *Salmonella e. Enteritidis* in poultry litter using a bacteriophage isolated from agricultural waste. For such, samples from swine farms distributed in the West Region of Santa Catarina, Brazil, were used for the isolation of bacteriophages, using the double-agar plate technique. The bacteriophage SM1, belonging to the Order Caudovirales and Family *Siphoviridae*, was isolated and propagated, showing lytic potential, against *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*. Two experimental sets were performed: In the first one, the stability of bacteriophage SM1 (1.8×10^6 PFU mL⁻¹) was evaluated in poultry litter as a function of the exposure time in days, for up to 35 days. Such litter came from 1, 3, 6 and 9 production flocks, all alkalinized at the field on a full scale with the addition of 10% lime. In addition, beds from 9 production flocks (ready to be removed from the breeding sheds) were treated with an additive of 10% eggshells (v/v), for the purposes of alkalinization, drying and valuation as biofertilizers. In the second experimental set, poultry litter with 6 production flocks were artificially contaminated with 2.5×10^5 CFU mL⁻¹ of *S. Enteritidis* and treated with bacteriophage SM1. The first treatment (T1) was carried out by applying by dripping 1.8×10^6 PFU mL⁻¹ of bacteriophage SM1, the reduction of *S. Enteritidis* being evaluated for up to 12h; In the second treatment (T2), two subsequent doses of SM1 were administered by dripping at 6h and 12h after T1. The bacteriophage SM1 remained stable, with no tendency to decay in any of the poultry litter tested. The bacteriophage SM1 was able to control 3Log₁₀ CFU/g of *S. Enteritidis* 6h after its application (T1). However, bacterial regrowth of 1.5 Log₁₀ CFU/g 8h after T1 administration was observed, demonstrating the need for re-treatment. Thus (T2), was conducted after 6h and 12h of T1, controlling 3Log₁₀ CFU/g of *S. Enteritidis*, without observation of bacterial regrowth. The present study highlights the potential use of the bacteriophage SM1 applied to the control of *S. Enteritidis* in poultry litter, which can be applied to other environmental matrices. Also, the need for experimental investigation and improvement of phage activity for the purpose of absolute *Salmonella* control in poultry husbandry are main steps for further phage environmental applications.

Keywords: microbiological control; viral isolation; environmental matrices.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Principais famílias fágicas e sua morfologia.....	18
Figura 2 –Diferentes ciclos de replicação viral dos bacteriófagos.....	20
Figura 3 – Delineamento geral das metodologias utilizadas no presente trabalho.....	24
Figura 4 – Esquema dos testes de inativação bacteriana em cama de aviário.....	29
Figura 5 – Perfil de lise do bacteriófago SM1.....	30
Figura 6 – Microscopia eletrônica de transmissão do bacteriófago SM1.....	31
Figura 7 – Citotoxicidade das partículas virais.....	33
Figura 8 – Contagem de <i>S. Enteritidis</i> em cama de aviário após aplicação do bacteriófago SM1.....	34
Figura 9 – Comportamento trifásico de <i>S. Enteritidis</i> após aplicação fágica	35
Figura 10 – Comportamento bacteriano após aplicações sucessivas do bacteriófago SM1.....	37
Figura 11 – Estabilidade do bacteriófago SM1 após sua aplicação em cama de aviário.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Médias da caracterização físico-química das amostras de cama de aviário.....	39
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA: Associação Brasileira de Proteína Animal

BHI: Brain-Heart Infusion (meio de cultura)

DO: Densidade Ótica

LB: Luria Bertani (meio de cultura)

LVA: Laboratório de Virologia Aplicada UFSC

MEM: Meio Essencial Mínimo (meio de cultura)

mL: Mililitros

MOI: Índice de Multiplicidade de Infecção (Multiplicity Of Infection)

PBS: Phosphate Buffered Saline (tampão fosfato-salino)

pH: Potencial Hidrogeniônico

S. Enteritidis: *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis

S. Typhimurium: *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium

SM1: Bacteriófago SM1, isolado de dejetos suínos (Swine Manure)

ST: Sólidos Totais

SV: Sólidos Voláteis

T1: Tratamento com a aplicação de apenas uma dose de bacteriófago

T2: Tratamento com a aplicação de doses consecutivas de bacteriófago

UFC: Unidade Formadora de Colônia

UFP: Unidade Formadora de Placa

uL: Microlitros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Criação animal e zoonoses no conceito de Saúde Única	15
1.2	Família Enterobacteriaceae e o gênero <i>Salmonella</i>	16
1.3	Resistência aos tratamentos antimicrobianos convencionais.....	17
2	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivo Geral.....	23
2.2	Objetivos Específicos.....	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	Isolamento, propagação e seleção dos bacteriófagos.....	24
3.2	Citotoxicidade do fluído fágico produzido.....	25
3.3	Microscopia eletrônica de transmissão.....	26
3.4	Identificação molecular.....	26
3.5	Estabilidade e tratamento de camas de aviários usando o bacteriófago SM1.....	27
3.5.1	<i>Camas de aviário</i>	27
3.5.2	<i>Estudo da estabilidade do bacteriófago SM1 em camas de aviários</i>	27
3.5.3	<i>Aplicação do bacteriófago SM1 em cama de aviário para fins de controle de S. Enteritidis</i>	28
3.6	Análises estatísticas.....	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1	Bacteriófago selecionado, propagado e caracterizado.....	30
4.2	Microscopia eletrônica de transmissão e caracterização molecular do bacteriófago SM1.....	30
4.3	Citotoxicidade do bacteriófago SM1 frente a células animais.....	32
4.4	Estudo da estabilidade do bacteriófago SM1 após aplicação em camas de aviários.....	33
4.5	Controle de <i>S. Enteritidis</i> em camas de aviário usando o bacteriófago SM1.....	35
4.6	Caracterização físico-química das camas de aviários após aplicação do bacteriófago SM1.....	38
5	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	41
6	REFERÊNCIAS	42
7	APÊNDICE - MATERIAL COMPLEMENTAR	49
7.1	Publicações e participações em eventos.....	49

7.2	Coorientação de trabalho de conclusão de curso.....	56
7.3	Artigos redigidos a partir da dissertação.....	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 Criação animal e zoonoses no conceito de Saúde Única

A crescente demanda global por produtos originários da criação animal e o avanço das áreas urbanas favorecem o contato cada vez mais intenso entre animais e humanos, e conseqüentemente a exposição humana a agentes infecciosos de origem zoonótica (NEWELL et al, 2010; LI et al, 2020). Sabe-se que mais de 70% dos patógenos emergentes e reemergentes possuem origem animal, sendo estes responsáveis por milhões de mortes e até mesmo bilhões de contaminações anuais em humanos (WOOLHOUSE & GOWTAGE-SEQUERIA, 2005; KARESH et al, 2012; OLIVAL et al, 2017).

As zoonoses são de grande interesse no âmbito de Saúde Única (RYU et al, 2017). Tal abordagem compreende o conjunto de estudos interligados à medicina humana e animal, associados ainda ao cuidado e conservação ambiental (BERKES et al., 2012). Neste sentido, melhorias nos serviços ambientais com o uso de conhecimentos da saúde humana e animal, tornaram-se possíveis, devido à aliança formada no final dos anos 90, entre a Organização Mundial da Saúde (OMS), a Organização Mundial de Sanidade Animal e a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) (NGUYEN-VIET et al., 2015). Dentre as preocupações da Saúde única, o enfrentamento às zoonoses destaca-se devido à alta incidência de organismos prejudiciais à saúde humana, podendo ser citados exemplos de enfermidades causadas por estas, como a gripe aviária, leishmaniose, toxoplasmose, diarreias causadas por enterobactérias e atualmente a COVID-19.

Vários fatores influenciam a manutenção e propagação destes patógenos nas populações, como por exemplo a cruza de espécies, o emprego de algumas técnicas de alimentação e manejo animal, e principalmente a ausência de estratégias de controle de doenças (WHO, 2014). Diversos são os patógenos com potencial zoonótico, entre os quais podemos citar vírus, protozoários, fungos, bactérias gram-positivas e gram-negativas. As formas de contágio variam entre os diferentes patógenos, entretanto o consumo de alimentos contaminados tem papel de destaque na transmissão das zoonoses.

A avicultura é um dos setores econômicos mais importantes no Brasil, terceiro maior produtor de carne de frango do mundo (FAO, 2021). O país foi responsável pela produção de 13.245 mil toneladas de carne de frango em 2019, sendo também líder no ranking de exportações mundial no mesmo ano, gerando uma receita de 6.994 milhões de dólares (ABPA, 2020). Entretanto, este setor de enorme impacto nacional enfrenta desafios, como por exemplo

a incidência de bactérias zoonóticas, como *Salmonella* spp. Visto isso, a atividade avícola interna do Brasil e para fins de exportação de carne de aves, a produção é legislada segundo a Instrução Normativa nº 20 (2016). Esta, preconiza o controle e monitoramento de *Salmonella* spp. nos estabelecimentos avícolas comerciais de frangos e perus de corte por meio da qualidade sanitária de camas de aviários (mistura de fezes, urina e maravalha, bem como aditivo de fonte de carbonato cálcico – normalmente a cal), requerendo inocuidade para bactérias das espécies *Salmonella enterica* Enteritidis e *Salmonella enterica* Typhimurium.

Tais normas geram grandes impactos na cadeia de produção avícola, considerando a alta incidência desta bactéria nos diferentes estágios de produção, processamento e consumo desta fonte de proteína, sendo impossível determinar a contribuição de cada estágio para o desencadear destas infecções em humanos (COX et al., 2020). Destaca-se, portanto, a importância da ausência destas bactérias em todas as etapas que envolvem a criação e destinação da carne de frango.

1.2 Família Enterobacteriaceae e o gênero *Salmonella*

Dentre os importantes patógenos causadores de infecções de origem alimentar, o grupo das Enterobactérias deve ser destacado. A família Enterobacteriaceae compreende bactérias gram-negativas, anaeróbicas-facultativas, e quimiotróficas, apresentando tanto metabolismo para respiração quanto para fermentação (SINGH & ANAND, 2020). Estes organismos apresentam grande resiliência ambiental, sendo capazes de sobreviver a alterações de temperatura e pH (SÄDE & BJORKROTH, 2013).

Dentre as enterobactérias de interesse à saúde humana, o gênero *Salmonella* destaca-se como potencialmente patogênico, sendo responsável por 46.623 casos confirmados de salmonelose em 2016 nos Estados Unidos, e 91.662 casos na Europa no ano de 2017 (CDC, 2019, EFSA, 2017). O gênero *Salmonella* divide-se em duas espécies e seis subespécies, compreendendo mais de 2 659 sorovares (sendo destes 2.639 pertencentes à espécie *Salmonella enterica* e 20 à *Salmonella bongori*) (ISSENHUTH-JEANJEAN et al, 2014; ANDINO & HANNING, 2015; RYAN et al., 2017). Dentre as principais características deste gênero podemos citar a presença de flagelos peritríquios, bem como sua resistência a uma ampla gama de pHs, variando entre 3,8 e 9,5, com ponto ótimo entre 6,5 e 7,5.

Apesar dos mais de 2.500 sorotipos de *S. enterica* já identificados, *Salmonella e.* Enteritidis e Typhimurium (*S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*) destacam-se como os sorovares mais relacionados às infecções alimentares (JONES et al, 2008; HENDRIKSEN et al, 2011).

Além disso, as infecções por estes sorovares estão entre as mais propensas à hospitalização do indivíduo contaminado, estando relacionadas à severidade dos sintomas, apesar da baixa taxa de mortalidade (JONES et al., 2008). Além disso, tais bactérias representam uma grande ameaça à produção animal, mostrando-se um desafio para o crescimento deste setor de grande impacto social e econômico, principalmente no setor avícola, responsável por 36% da produção anual de carnes (EFSA, 2017; RITCHIE & ROSER, 2017). Os ovos também podem ser uma importante fonte de contaminação, no qual podemos encontrar variações nas formas de transmissão entre os sorotipos, com *S. Enteritidis* podendo ser transmitida verticalmente por via transovariana, enquanto *S. Typhimurium* apresenta a capacidade de penetrar a casca dos ovos (BRADEN, 2006; MARTELLI & DAVIES, 2012).

1.3 Resistência aos tratamentos antimicrobianos convencionais e a estratégia de uso de bacteriófagos

Um dos principais agravantes da ameaça representada pelas zoonoses é a crescente resistência dos microrganismos aos métodos convencionalmente utilizados para seu controle, sendo estes em sua grande parte medicamentos antibióticos. De fato, a resistência tem se mostrado um grande problema em diversos setores de saúde humana e animal, sendo os usos indevidos e exacerbados os seus principais determinantes. Nos Estados Unidos, por exemplo, 80% do consumo anual destes medicamentos é destinado à criação animal (MARTIN et al., 2015). Além do desenvolvimento de resistência, o uso de antibióticos pode deixar resíduos em alguns produtos como a carne de frango (PATEL et al., 2018).

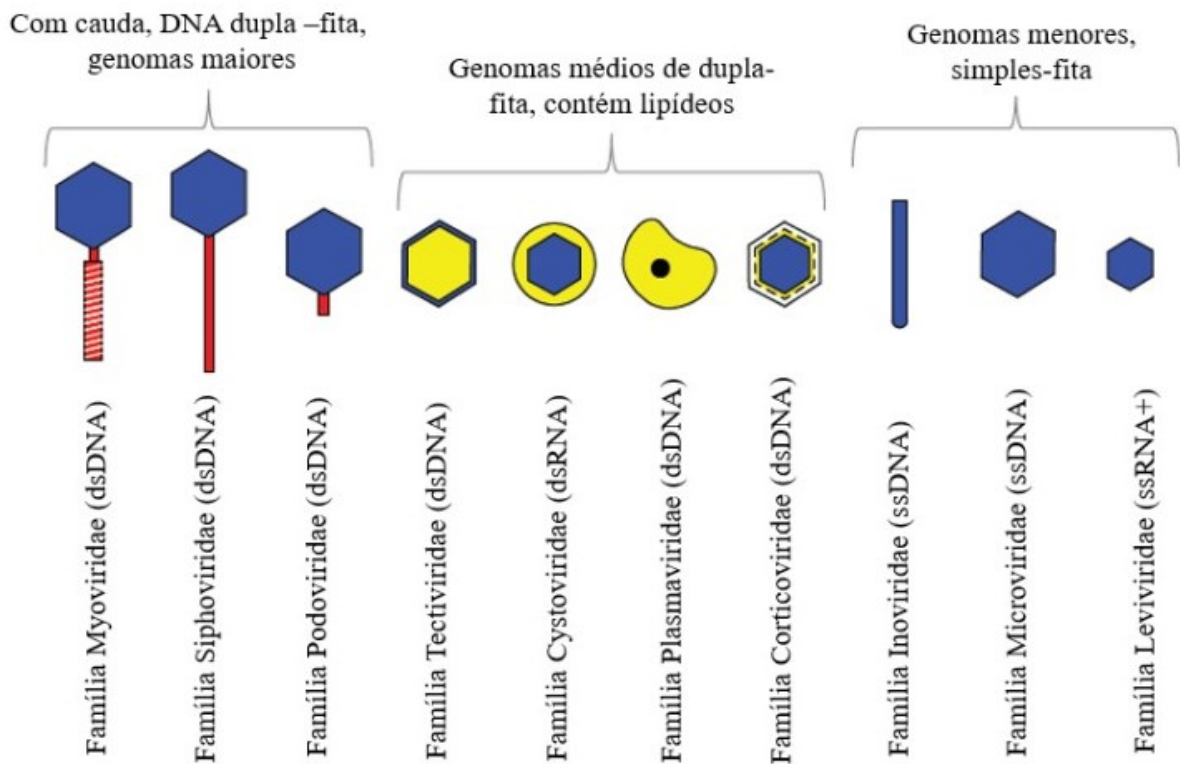
A resistência à antibióticos no gênero *Salmonella* vem crescendo ao longo dos anos, tendo início nos antibióticos mais antigos (cotrimoxazol, cloranfenicol, ampicilina), estendendo-se por medicamentos de grande importância para o tratamento de infecções em humanos, como as fluoroquinolonas (ciprofloxacina) e cefalosporinas de amplo espectro (BUTAYE et al., 2006; PARRY & THRELFALL, 2008; CHEN et al., 2013). O agravamento da resistência aos tratamentos convencionais aumenta a severidade e conseqüentemente a morbidade e a mortalidade destas infecções, levando ao uso de antimicrobianos de última linha, como carbapenêmicos (WHO, 2011; ANTUNES et al., 2016).

Diversos estudos apontam o impacto dos animais, principalmente aves, e de alimentos provenientes de sua criação e consumo, no crescimento da resistência no gênero *Salmonella* (BUTAYE et al., 2006; SEIFFERT et al., 2013; AARESTRUP, 2015). Neste sentido, alternativas que possibilitem a redução das doses utilizadas, bem como mecanismos de ação

alternativos aos atualmente presentes nos antimicrobianos disponíveis, mostram-se essenciais no combate à crescente resistência.

Descobertos independentemente em 1915 e 1917 os bacteriófagos, ou fagos, foram descritos por D’Herelle (1926) como “vírus capazes de parasitar bactérias”, sendo que o sufixo fago se refere ao seu “desenvolvimento às custas de”, devido seu metabolismo dependente de um hospedeiro procarionte (D’HERELLE, 1926; DELBRÜCK, 1942; LURIA, 1950). Os bacteriófagos são as entidades biológicas mais abundantes do globo terrestre, sendo estimadas $\sim 10^{30}$ (um nonilhão) de espécies distribuídas entre os mais diversos ambientes, nos quais atuam como componentes ativos dos ecossistemas (FUHRMAN, 1999; BALTER 2000; ROHWER, 2003; CLOKIE, 2011). São também muito abundantes nos oceanos, sendo consideradas as partículas predominantes neste ambiente.

Figura 1. Principais famílias fágicas e sua morfologia



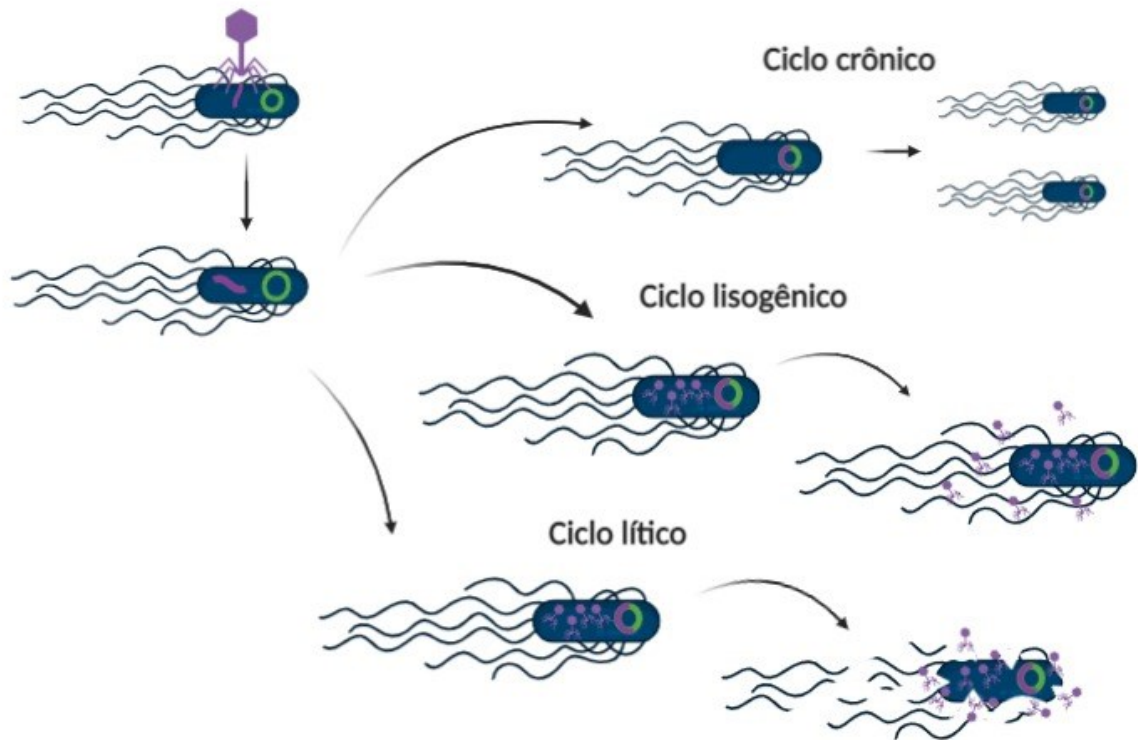
Famílias de bacteriófagos, com suas respectivas morfologias, tipos e tamanhos genômicos. Imagens azuis representam capsídeo, vermelhas representam cauda e a cor amarela indica lipídeos. As figuras não estão representadas em escala, e são uma adaptação de Hyman & Abedon (2012).

Os fagos podem apresentar material genético do tipo DNA ou RNA, sendo este revestido por um capsídeo proteico com formas variáveis de acordo com a biologia de cada vírus. Estas características são utilizadas pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV)

para classificação dos bacteriófagos (Figura 1). Entre os fagos sequenciados até o presente momento, sabe-se que grande parte destes possui material genético do tipo DNA dupla fita (94,1%), DNA simples fita (4,6%), RNA dupla fita (0,4%) e RNA simples fita (0,9%) (CASEY et al., 2017). Além disso, os vírus também são classificados em ordens, sendo os bacteriófagos em sua grande maioria pertencentes à ordem *Caudovirales* (96%), dentro da qual podem-se observar diferentes famílias, sendo suas principais representantes *Siphoviridae*, (61%), *Myoviridae* (24.5%) e *Podoviridae* (14%) (CASEY et al., 2017). Os formatos virais também podem ser bastante variados, com fagos envelopados que infectam grupos de mycoplasma, e especial variedade distribuída entre os fagos de archaeas (ACKERMANN, 2007; ATANASOVA et al., 2012).

O ciclo de replicação pode variar entre os bacteriófagos, sendo os principais descritos o ciclo lítico, o ciclo lisogênico e o fago crônico (Figura 2). O fago crônico insere seu material genético no genoma de seu hospedeiro, sendo replicado a cada ciclo celular, alguns exemplos deste ciclo podem ser vistos nos bacteriófagos M13 e bacteriófagos que parasitam archaeas. O ciclo lisogênico se assemelha ao crônico, porém após a integração do genoma fágico, o vírus assume um caráter não infeccioso conhecido como prófago. Entretanto, em casos de estresse ou mudanças ambientais a bactéria pode ser forçada a produzir e liberar novas partículas virais. Um exemplo deste ciclo viral pode ser visto no bacteriófago T1. Por fim, no ciclo lítico, o bacteriófago insere o genoma no seu hospedeiro, sendo este forçado a produzir novas partículas virais que serão liberadas com a lise da célula bacteriana. O ciclo lítico possui como exemplos clássicos os bacteriófagos T4 e MS2 (CLOCKIE et al., 2011; CANN 2016; JANCZUK et al., 2016).

Figura 2. Ciclos de replicação dos bacteriófagos



Diferentes ciclos de replicação viral dos fagos, sendo estes o ciclo lítico, lisogênico e crônico. No ciclo crônico, o bacteriófago insere seu genoma no DNA da bactéria, sendo replicado junto com a multiplicação bacteriana. O ciclo lisogênico permite a multiplicação das cópias virais e a saída da célula hospedeira por brotamento, sendo a lise bacteriana outra possibilidade de evasão neste ciclo. O ciclo lítico por sua vez, tem a lise da célula hospedeira como única forma de saída das novas partículas virais. Fonte: Autora.

Existem ainda evidências de outros ciclos de replicação de bacteriófagos, como a pseudolisogenia (CENENS et al., 2013). Entretanto, para fins de controle bacteriano, mostra-se preferível o uso de fagos com ciclo lítico, visto que além do seu grande poder de controle bacteriano, o processo de lise impede a recuperação do hospedeiro (LOC-CARRILLO & ABEDON, 2011). Pode-se ressaltar ainda sua alta especificidade de hospedeiro como outro fator favorável à sua utilização ambiental (SKURNIK et al., 2007).

Desde a descoberta dos bacteriófagos, estes têm sido aplicados em diferentes fagoterapias para o combate de numerosas espécies bacterianas. No caso do gênero *Salmonella*, podem ser citados alguns coquetéis de fagos para uso comercial, já disponíveis no mercado, como SalmoLyse® e BioTector, sendo ambos utilizados como aditivos na comida animal (OH & PARK, 2017). Outras formulações disponíveis podem ser aplicadas em superfícies de aço inoxidável ou vidro, como o coquetel de seis fagos líticos SalmoFresh™, ou ainda para a desinfecção de alimentos, indo de encontro à grandes demandas comerciais (WOOLSTON et al., 2013).

Embora bastante promissora, a aplicação de fagos como biocontroladores também apresenta desafios e lacunas de informações sobre estas entidades biológicas tão abundantes. Para que seja possível o uso de bacteriófagos específicos mostra-se essencial a correta identificação dos patógenos contaminantes (KUTATELADZE & ADAMIA, 2010). A diversidade de sorotipos e subespécies entre bactérias patogênicas também pode ser uma dificuldade para a eficiência do uso de bacteriófagos, uma vez que o número de cepas variantes em uma mesma espécie pode ser bastante amplo (SKURNIK et al., 2007). A titulação das contaminações também deve ser conhecida, bem como a multiplicidade de infecção (MOI) necessária para o controle dos procariontes presentes.

Além disso, inúmeros vírus serviram como fatores de virulência para transferência gênica ao longo da história da biologia, da mesma forma, alguns bacteriófagos podem realizar transferências de genes entre bactérias. Esta troca de material pode ser problemática em alguns casos, principalmente devido à lise bacteriana, que pode disponibilizar tais genes no ambiente, mas também devido à possibilidade de propagação de genes de resistência tanto à antibióticos quanto aos próprios bacteriófagos (VERHEUST et al., 2010, MIZOGUCHI et al., 2003). Esta transferência de genes se mostra ainda mais preocupante nos bacteriófagos lisogênicos, ressaltando a importância do conhecimento e uso de vírus com a biologia adequada para cada patógeno específico (FORTIER & SEKULOVIC, 2013; CALERO-CÁCERES, 2019; GARIN-FERNANDEZ, 2019).

Este cenário chama a atenção para o destino dos substratos com aplicação de bacteriófagos, uma vez que os mesmos podem possuir grande estabilidade ambiental. Muitos dos resíduos da produção animal, como camas de aviário e dejetos animais, são utilizados como fertilizantes agrícolas, sendo dispostos em campos e lavouras a fim de que os nutrientes presentes na matéria orgânica sejam inseridos novamente na cadeia produtiva. Esta reciclagem de nutrientes afeta todos os níveis de saúde, uma vez que o desequilíbrio ambiental, animal ou humano afeta todas estas esferas interligadas (DIXON et al., 2014; RYU et al, 2017).

Neste sentido, os bacteriófagos podem ser aliados dentro da agroindústria em uma abordagem de Saúde Única. Tal abordagem entende que a resistência aos antibióticos tem várias causas e necessita de diferentes ações para ser combatida, entretanto o conhecimento e a redução da administração destes medicamentos mostra-se um passo primordial na luta à resistência (MCEWEN & COLLIGNON, 2018).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Isolar, caracterizar, propagar e aplicar bacteriófago lítico biocontrolador de *Salmonella* em camas aviárias.

2.2 Objetivos Específicos

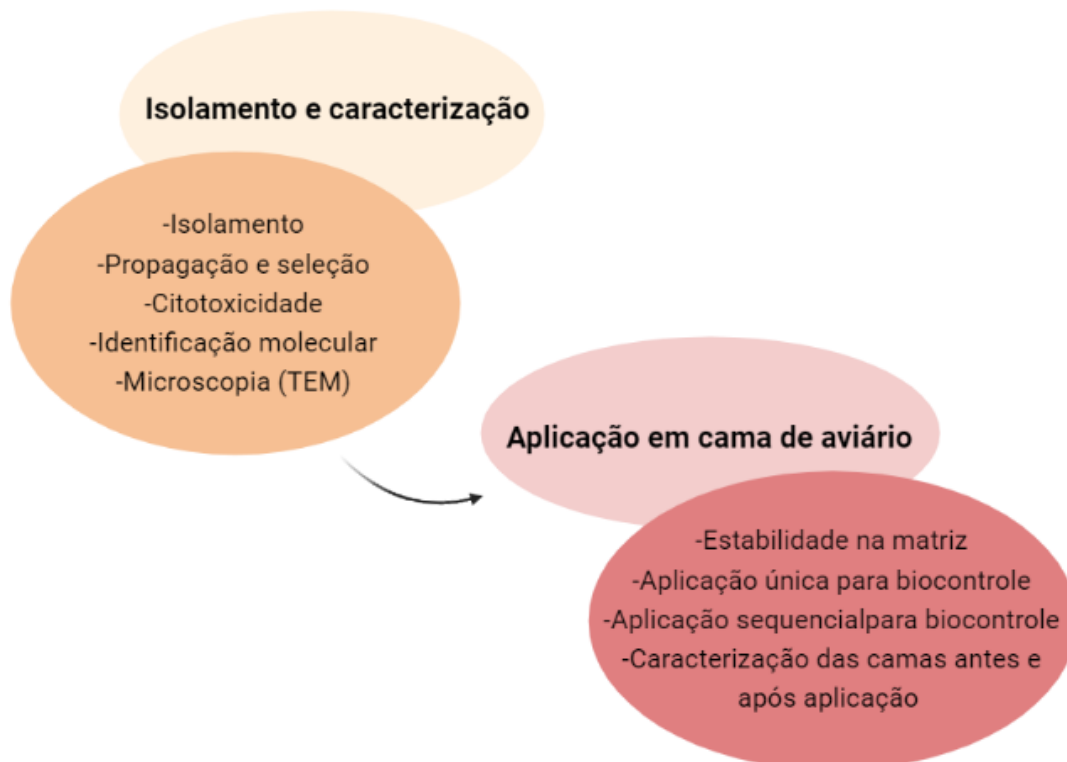
- Prospectar bacteriófagos líticos a partir de amostras ambientais (dejeito bruto suinícola, efluente suinícola tratado em biodigestão, cama de aviário e fezes brutas de galinhas);
- Selecionar, propagar e identificar molecularmente e estruturalmente um bacteriófago com potencial lítico, de baixa citotoxicidade e capaz de infectar tanto *S. Typhimurium*, quanto *S. Enteritidis*;
- Investigar a estabilidade em função do tempo do isolado bacteriofágico frente a camas de aviário de diferentes lotes de produção;
- Controlar contaminações por *S. Enteritidis* em cama de aviário mediada pelo bacteriófago aqui prospectado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O delineamento amostral utilizado na realização do presente trabalho foi dividido em: 1) Isolamento e caracterização do bacteriófago lítico de interesse para o estudo e 2) Cultivo e aplicação do bacteriófago selecionado para fins de estudos de estabilidade viral e capacidade de controle de *S. Enteritidis* em camas de aviários.

Os experimentos foram conduzidos nas dependências do Laboratório de Virologia Aplicada (LVA) situado na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e as análises físico-químicas das camas de aviário foram gentilmente realizadas na Embrapa Suínos e Aves. O delineamento experimental básico utilizado para a realização do presente trabalho está apresentado na Figura 3.

Figura 3. Delineamento experimental básico utilizado para a realização do presente trabalho.



Fonte: Autora.

3.1 ISOLAMENTO, PROPAGAÇÃO E SELEÇÃO DOS BACTERIÓFAGOS

Para o isolamento dos bacteriófagos, foram utilizadas diferentes matrizes ambientais coletadas no estado de Santa Catarina, Brasil. Para isso, efluente de saída de biodigestor de dejetos suínocolas, camas de aviários, fezes brutas de aves (frango de corte) da agricultura

familiar, dejetos de suíno bruto e efluente humano proveniente de estação de tratamento de esgoto foram utilizados como fonte de isolamento de bacteriófagos. Cada amostra foi recebida e armazenada em geladeira a 4°C até o momento de seu uso. As amostras foram eluídas com o uso de tampão salino fosfato 1% (PBS) em pH 7,0 e filtradas através de um filtro de celulose de 0,22 µm.

O isolamento dos bacteriófagos foi realizado de acordo com os protocolos descritos na ISO 10705-1:1995 com o uso de *Salmonella enterica* Typhimurium (ATCC® 14028™) como hospedeira. Brevemente, 1 mL da amostra filtrada foi adicionado a 1 mL da cultura bacteriana em sua forma exponencial de crescimento (0,6 DO), e 1 mL de Brain-Heart Infusion (BHI) adicionado de 1,2 % de ágar bacteriológico – (Kasvi®). Esta solução foi homogeneizada e disposta sobre uma placa contendo uma camada prévia de 10 mL de BHI sólido. As placas foram então invertidas e incubadas em estufa bacteriológica por até 12 horas à 37°C para observação de Unidades Formadoras de Placa de Lise (UFP).

Após a incubação, as placas contendo diferentes padrões de lise foram contabilizadas e retiradas do duplo-ágar, sendo que os bacteriófagos ali presentes foram eluídos em tampão SM buffer (50 mM Tris HCl, pH 7.4; 0.1 M NaCl; 8 mM, MgSO₄; pH 7.5), por 12h, à 4°C sob agitação. Em seguida, o eluato foi centrifugado a 10,000 ×g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi filtrado e adicionado a um Erlenmeyer contendo 25 mL de meio Luria Bertani - Difco™ (LB) com 1 mL da cultura bacteriana de *S. Typhimurium* em fase exponencial de crescimento (0,6 DO). Esta mistura foi então levada à estufa bacteriológica por 18h à 37°C para a propagação viral. Após três ciclos de propagação, o título viral foi acessado por meio da técnica de duplo-ágar, e expresso em UFP/mL.

Em seguida, os bacteriófagos isolados foram avaliados quanto à sua capacidade de lise e replicação em até 18h (aumento da titulação). Dentre os cinco diferentes padrões de lise, um foi selecionado, em função da eficiência de replicação bacteriofágica em até 3h. Este foi denominado bacteriófago SM1, devido seu isolamento a partir de amostras de dejetos suíno, (do inglês “swine manure”), sendo quantificado ($1,8 \times 10^7$ UFP mL⁻¹) e usado para caracterização genômica, de microscopia eletrônica, para experimentos de citotoxicidade fágica, estabilidade fágica e controle bacteriano em camas de aviários.

3.2 CITOTOXICIDADE DO FLUÍDO FÁGICO PRODUZIDO

A fim de investigar a seguridade da aplicação viral, foram realizados ensaios de citotoxicidade do fluido viral, contendo bacteriófago SM1. Para tal, ensaios em cultura celular

animal foram realizados, tendo-se como células modelos a linhagem VERO (oriundas de rim de macaco verde da África -ATCC® CCL81™) e a linhagem A549 (oriundas de carcinoma de pulmão humano - ATCC® CCL-185™). Para o ensaio, o fluido viral de SM1 ($1,8 \times 10^7$ UFP mL⁻¹) foi centrifugado a 4500 rpm por 5 minutos, filtrado em filtro de celulose de 0,22 µm, tratado com 1% de antibióticos (Penicilina/Streptomicina/Anfotericina) e diluído (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:264).

As células VERO e A549 previamente cultivadas e dispostas em placas de 24 cavidades, foram lavadas com solução salina (PBS pH 7,0) e receberam o inóculo de 100µl diluições do fluido viral, em duplicata, sendo então incubadas em estufa de CO₂ a 37°C durante 1h. Em seguida, o sobrenadante foi aspirado e 1 mL do meio de manutenção (Meio Mínimo Essencial -MEM 1X, 1% Antibióticos, 2% Soro Fetal Bovino) foi adicionado em cada poço. As placas foram então levadas novamente à estufa de cultura celular animal, na qual permaneceram por 48h. Após esse período houve remoção do meio de cultura, lavagem celular com solução de PBS e coloração de células viáveis usando 250µl de preto de naftaleno. A citotoxicidade do fluido viral foi avaliada por meio de comparação da viabilidade celular entre células controle e aquelas inoculadas com os fluidos virais puros e diluídos.

3.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

A solução fágica ($1,8 \times 10^7$ UFP mL⁻¹) foi centrifugada a 3.000 rpm por 10 min, o pellet formado foi ressuspensão em solução fixadora (glutaraldeído 2,5% + fosfato) e incubado por 2h, para posterior centrifugação a 1000 rpm por 10 min. Em seguida ocorreu a adição de 1 mL de solução fosfato 0,1 M, e outra centrifugação a 3000 rpm por 10 min 4°C. O pellet foi então ressuspensão e um volume de 8 µL desta suspensão foi depositado na superfície de uma tela de microscopia eletrônica (Kosh®, 200 mesh, 3 mm). O excesso de amostra foi removido com papel absorvente e adicionado uma gota de solução aquosa de acetato de uranila 2% (m/v) (Sigma Aldrich®) na superfície da tela, deixando em contato por 15 seg. O excesso de acetato de uranila foi novamente removido com papel absorvente. A tela permaneceu em processo de secagem em temperatura ambiente, aproximadamente 24°C por 24h. Posteriormente foi realizada a observação em microscópio eletrônico de transmissão em 80 kV e aumentado em mais de 85000 vezes, no Laboratório de Microscopia Eletrônica (LCME) - UFSC.

3.4 IDENTIFICAÇÃO GENÔMICA

Para a identificação molecular do bacteriófago, a solução de meio de cultivo (LB) contendo o fago SM1 foi filtrada com filtro de celulose (0,22 μm) e em seguida realizada a extração dos ácidos nucleicos virais com o kit comercial PureLink Viral RNA/DNA (Invitrogen-Life Technologies). Em seguida o material genético extraído foi encaminhado à empresa parceira Neopropecta, para a realização do sequenciamento via MiSeq - Illumina, e análise dos dados gerados. A montagem de genomas e busca em bases de dados se deu pela trimagem dos dados brutos com Prinseq e a busca por famílias e espécies virais com especificidade para bactérias com o uso do programa de classificação taxonômica Kaiju, tendo RefSeq como banco de sequências.

3.5 ESTABILIDADE E TRATAMENTO DE CAMAS DE AVIÁRIOS USANDO O BACTERIÓFAGO SM1

3.5.1 Camas de aviário

Amostras de camas de aviário (sendo esta uma mistura de serragem, excretas de aves e 10% de calcário), sabidamente negativas para *Salmonella* spp. (ISO 6579-1: 2017). foram coletadas em seis diferentes unidades de criação de aves distribuídas no Oeste do estado de Santa Catarina, Brasil. Uma segunda coleta foi realizada para obtenção de camas de aviário utilizadas durante diferentes lotes de criação. Ressalta-se que 1 lote de criação corresponde a um ciclo de produção de aves, que dura cerca de 40-45 dias, durante o qual as aves permanecem sobre esta matriz. Foram coletadas camas de aviários oriundas de 1, 3, 6 e 9 lotes de produção, sendo todas estas alcalinizadas à campo em escala real com adição de 10% de calcário. A amostragem foi realizada através da coleta de 20g de cama de aviário em 15 pontos distribuídos randomicamente ao longo dos galpões aviários.

Ainda, camas de 9 lotes de produção (prontas para serem removidas dos galpões de criação), foram tratadas com 10% de cascas de ovos secas à 280°C (v/v), como aditivo alternativo ao calcário, para fins de alcalinização, secagem e valoração das camas como biofertilizantes. Esta alcalinização acontece rotineiramente nas trocas de lotes de aves, visto que as camas de aviário permanecem entre estes, podendo ser reutilizadas por até 9 lotes. As camas de aviários foram avaliadas de acordo com suas características físico-químicas, considerando-se teor de sólidos totais, fixos e voláteis, pH, e amônia NH₃-N, segundo APHA, 2012.

3.5.2 Estudo da estabilidade do bacteriófago SM1 em camas de aviários

A estabilidade do bacteriófago SM1 foi avaliada frente às camas de aviários, considerando camas de 1, 3, 6 e 9 lotes. Ainda, a cama de 9 lotes foi aditivada com 10% v/v de cascas de ovos galvanizadas com gramatura média de 300 μ M (cascas gentilmente cedidas pelas Profas. Aline Viancelli da Universidade do Contestado).

Para conduzir os experimentos de estabilidade, 100g de cama de aviário (sabidamente livres de *Salmonella*), foram alocadas em recipientes plásticos estéreis, formando uma camada de 1 cm de espessura. Em seguida as camas foram inoculadas com 10 mL de solução contendo 3×10^7 UFP/mL de SM1. A estabilidade do bacteriófago foi aferida por meio do ensaio de placa de duplo-ágar conforme a ISO 10705-1:1995, durante 35 dias.

3.5.3 Aplicação do bacteriófago SM1 em cama de aviário para fins de controle de *S. Enteritidis*

Para os testes envolvendo a aplicação do bacteriófago SM1 para fins de controle bacteriano em camas de aviários, 25g de camas de aviários (provenientes de 6 lotes de criação) foram distribuídas em recipientes plásticos, mantendo-se uma camada de aproximadamente 1 cm. As camas foram então contaminadas com 2,5 mL da solução contendo 1×10^5 UFC mL⁻¹ de *S. e. Enteritidis*, em duplicatas independentes. Após 1h de aclimatação à 25°C, as camas foram tratadas com a adição de 10 mL de solução contendo $1,8 \times 10^6$ UFP mL⁻¹ do bacteriófago SM1 (multiplicidade de infecção - MOI 10:1), por gotejamento. O MOI foi estabelecido tendo em vista as características da matriz utilizada, sendo que sua baixa umidade poderia dificultar o encontro dos fagos com seu hospedeiro. Camas de aviário sem a adição de *S. Enteritidis*, e camas de aviário com *S. Enteritidis*, mas sem aplicação do bacteriófago SM1 foram utilizadas como controles experimentais.

Foi realizada a quantificação de *S. e. Enteritidis* em função do tempo, utilizando amostragens de 1g de cama de aviário nos tempos 0, 2, 4, 6, 8 e 12h. Para a quantificação das bactérias utilizou-se um meio diferencial e seletivo, conhecido como ágar XLD (xilose, lisina, desoxicolato - Kasvi). As confirmações se deram por meio de teste bioquímico utilizando o Kit Painei G[®]. As inoculações das amostras foram realizadas nas diluições 1:10 e 1:100 e as leituras realizadas em 24 e 48 h após a incubação em estufa bacteriológica a 37°C, de acordo com o descrito na ISO 6579-1: 2017. Devido ao recrescimento de colônias bacterianas típicas de *Salmonella* após 7h do tratamento inicial (TI), a reaplicação do bacteriófago SM1 foi conduzida

em um segundo conjunto experimental (Tratamento 2 – T2) seguindo a mesma metodologia já descrita, considerando uma aplicação nos tempos 0, 6 e 12h, sequencialmente.

O esquema representativo dos experimentos conduzidos está apresentado na Figura 4.

Figura 4. Esquema ilustrando os testes de inativação de *Salmonella* Enteritidis

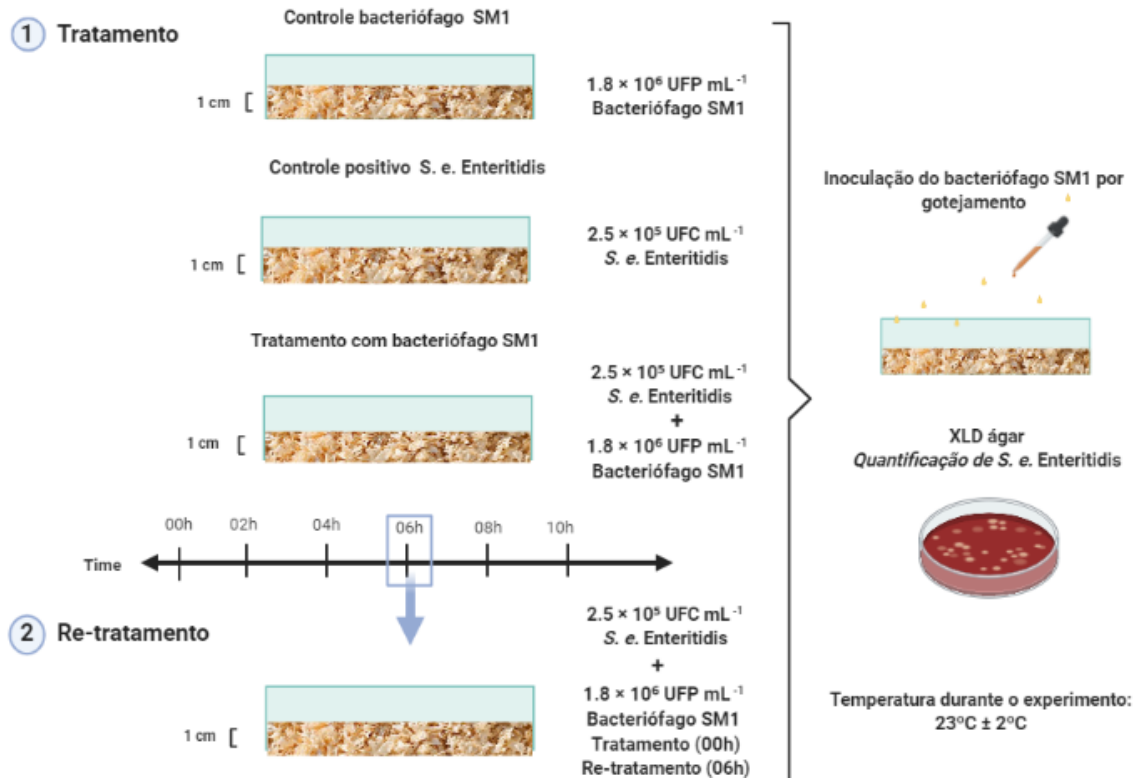


Ilustração esquemática dos testes de inativação de *Salmonella e. Enteritidis* em cama de aviário com aplicações do bacteriófago SM1. Fonte: Autora.

3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

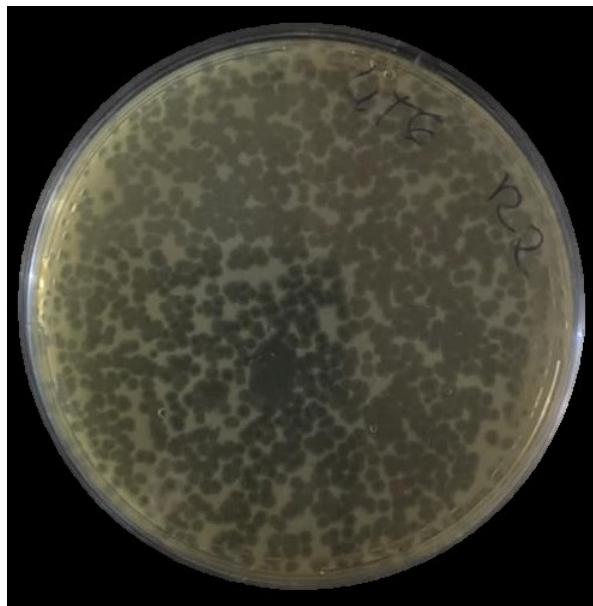
Os testes de análise de variância (ANOVA) e regressão linear foram realizados usando o software GraphPad Prism 6.0 (EUA). Considerou-se significativas diferenças em que o valor de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Bacteriófago selecionado, propagação e caracterização

A seleção do bacteriófago para aplicação em cama de aviário levou em consideração a capacidade de aumento da titulação viral em repasses virais, além da capacidade de infectar *in vitro* tanto *S. Enteritidis* quanto *S. Typhimurium*, a qual foi observada apenas no bacteriófago isolado a partir da amostra de dejetos suínolas. Este foi denominado bacteriófago SM1. O aumento de sua titulação também foi satisfatório, visto que em três ciclos de replicação o mesmo atingiu a contagem desejada para aplicação na matriz, sendo esta $1,8 \times 10^7$ UFP mL⁻¹. O perfil lítico pode ser observado na Figura 5.

Figura 5. Perfil de lise do bacteriófago SM1 em ensaio de placa de lise.

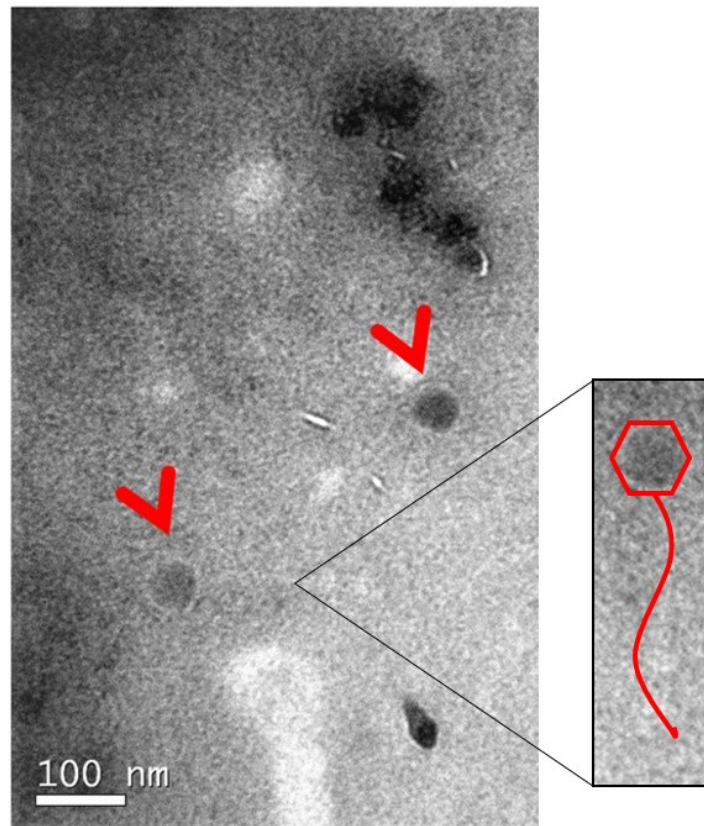


Perfil de lise apresentado pelo bacteriófago SM1 após 12h em contato com a bactéria hospedeira *S. Typhimurium*.
Fonte: Autora.

4.2 Microscopia eletrônica de transmissão e caracterização molecular do bacteriófago SM1

As primeiras imagens obtidas com a microscopia eletrônica de transmissão permitiram a visualização da estrutura do bacteriófago SM1 (Figura 6). Foi possível observar que o bacteriófago SM1 é formado por um capsídeo icosaédrico de aproximadamente 30 nm, contendo uma cauda anexa, indicando tratar-se de um vírus da ordem Caudovirales – imagens realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica (LCME) - UFSC.

Figura 6. Microscopia eletrônica de transmissão do bacteriófago SM1. As setas indicam o capsídeo viral, icosaédrico.



Primeiras imagens obtidas com microscopia eletrônica de transmissão demonstrando a morfologia típica da ordem Caudovirales, apresentada pelo bacteriófago SM1. Fonte: Autora.

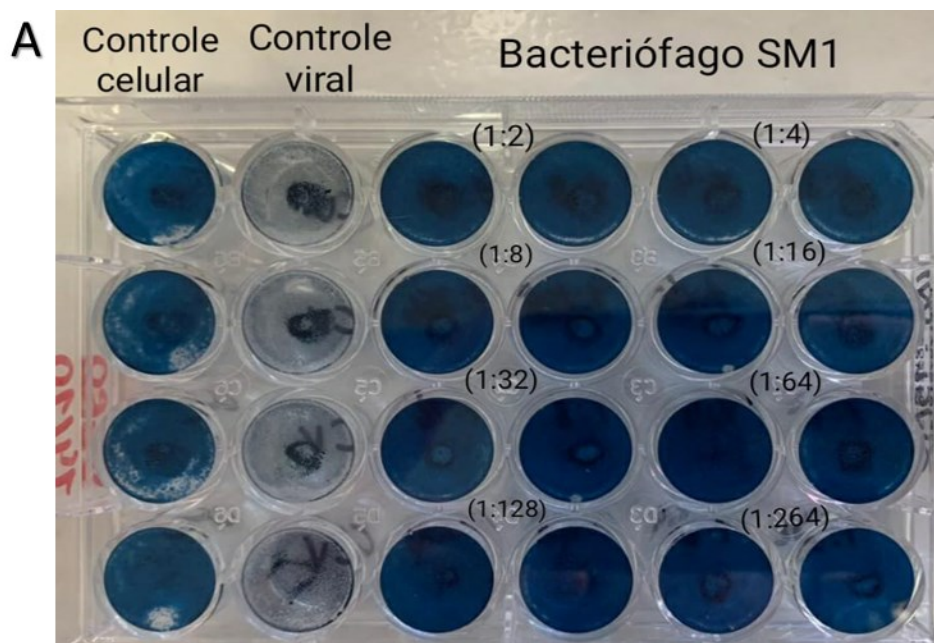
O sequenciamento viral via MiSeq - Illumina gerou 3.375 reads identificados como provenientes de bacteriófagos, sendo que o bacteriófago SM1 foi classificado na ordem Caudovirales e família *Siphoviridae* (correspondendo aos 3.307 reads). Esta classificação confirma os dados obtidos nos testes iniciais de MET (número do depósito no GenBank: BankIt2478666). Os vírus pertencentes à família *Siphoviridae* apresentam caudas finas, longas e não contráteis, formada pelo empilhamento de discos compostos por seis subunidades proteicas. Seu capsídeo e cauda são montados separadamente, além disso, estes bacteriófagos possuem DNA dupla-fita como material genético, sendo o empacotamento e a organização deste uma das principais características utilizadas para classificações dentro da família.

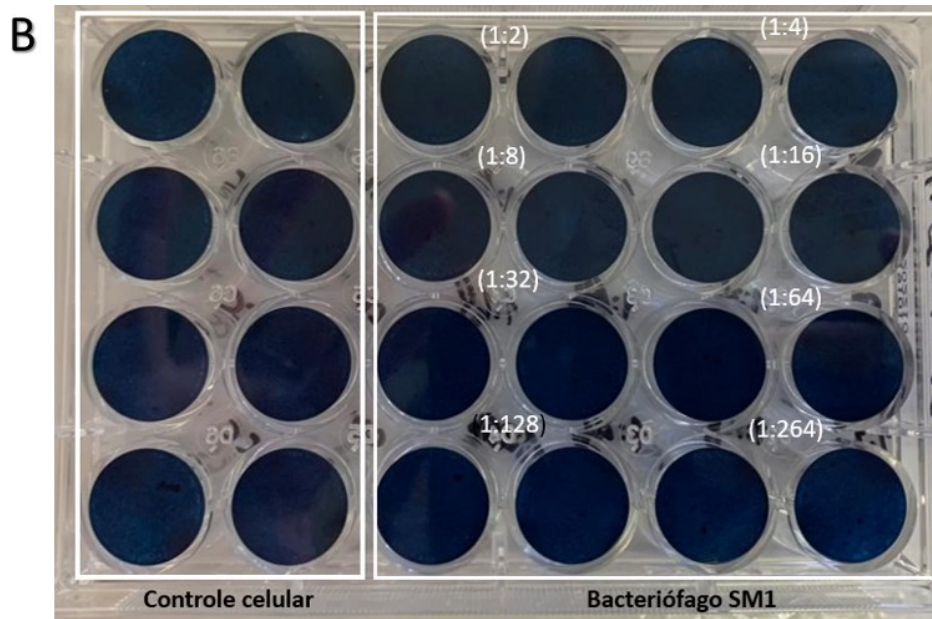
4.3 Citotoxicidade do bacteriófago SM1 frente a células animais

O ensaio de citotoxicidade em células VERO e A549 demonstrou que não houve morte celular após contato de 48h com 100µl ($1,8 \times 10^7$ UFP mL⁻¹) da suspensão de SM1,

considerando diluições que variaram de 1:2 até 1:264, evidenciando que tal fago não possui capacidade citotóxica para células animais, indicando assim a segurança de sua aplicação no ambiente de criação animal (Figura 7). A baixa toxicidade deve-se principalmente à constituição das partículas virais, sendo os bacteriófagos compostos por proteínas e ácidos nucleicos, tendo como produtos de sua degradação aminoácidos e ácidos nucleicos, além de sua alta especificidade de hospedeiro (KUTTER et al., 2010, SKURNIK et al., 2007). De fato, a baixa toxicidade apresentada pelos bacteriófagos os torna uma alternativa sanitariamente segura aos conservantes químicos, alguns exemplos podem ser vistos no uso de bacteriófagos para controle de *Salmonella* spp. na indústria alimentícia, na desinfecção de sucos e vegetais para consumo humano (JHAMB, 2014; EL-DOUGDOUG et al, 2019; THUNG et al, 2019).

Figura 7. Ensaio de citotoxicidade em culturas de células animais (VERO e A549).



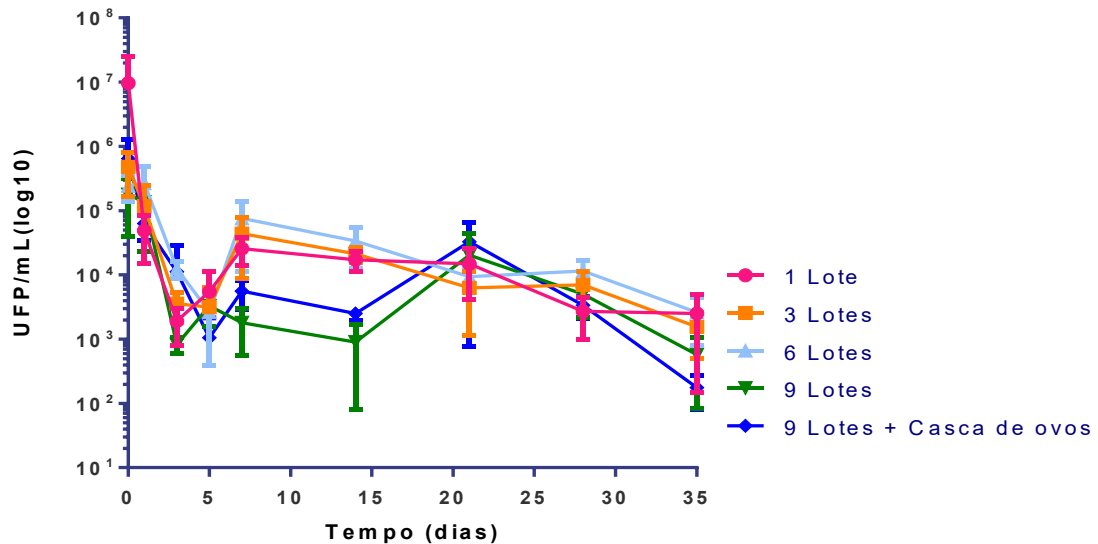


(A) Placa de 24 cavidades contendo células VERO, após ensaio de citotoxicidade do bacteriófago SM1; (B) Placa de 24 cavidades contendo células A549, após ensaio de citotoxicidade do bacteriófago SM1. Observa-se como controles o controle celular (preservado) e controle com vírus que destruíram as células VERO. Fonte: Autor

4.4 Estudo da estabilidade do bacteriófago SM1 após aplicação em camas de aviários

O perfil da estabilidade do bacteriófago SM1 nas camas de aviários foi avaliado durante 35 dias (Figura 8). O bacteriófago SM1 sofreu uma inativação natural média de $2\log_{10}$ em todas as camas ao longo do período de 35 dias, sendo que as reduções de SM1 nas camas de 1, 3 e 6 lotes não apresentaram variações significativas durante o período de acompanhamento ($p > 0,05$). No entanto, a estabilidade de SM1 reduziu significativamente ($3\log_{10}$ UFP/g) em camas de 9 lotes a partir dos primeiros 7 dias de aplicação do fago ($p = 0,00056$).

Figura 8. Estabilidade do bacteriófago SM1 após sua aplicação em cama de aviário.



Enumeração do bacteriófago SM1 ao longo do tempo após sua nas camas de aviário com diferentes tempos de utilização e adições de carbonatos. Fonte: Autora.

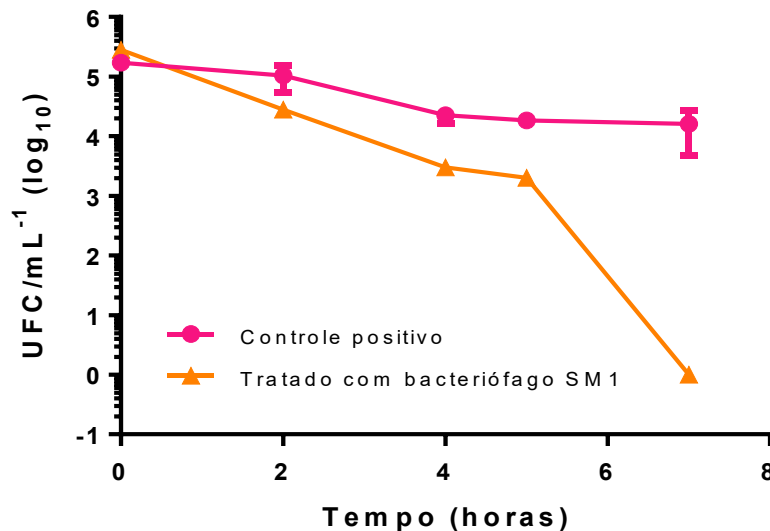
Esse comportamento foi significativamente distinto do observado entre camas com 9 lotes e a mesma tratada com 10% de cascas de ovos ($p=0,018$), podendo representar uma importante alternativa para tratamentos curtos com bacteriófagos, seguido da perda de sua capacidade infecciosa após ser usado como biocontrolador bacteriano. As cascas de ovos são fontes abundantes de carbonato de cálcio, sendo este responsável por 96% de sua composição (OLIVEIRA et al., 2013). Este material muitas vezes representa um problema, devido as largas quantias geradas por indústrias e sua disposição ambiental não planejada (GAO & XU, 2012; OLIVEIRA et al., 2013). As cascas de ovos também apresentam potencial para outras aplicações ambientais, como tratamento de águas, podendo ainda enriquecer mineralmente as camas de aviário antes de seu uso como fertilizante (LACA et al., 2017).

De maneira geral, essas alternativas representam processos importantes para gerenciamento e gestão dos resíduos da avicultura, visando manutenção sanitária, uma vez considerando o reuso de camas na cadeia produtiva, bem como sua disposição no solo para fins de biofertilização, já que são resíduos ricos em nutrientes, principalmente em nitrogênio que provem de proteínas e aminoácidos ali contidos (ENTICKNAP et al, 2006; BOLAN et al., 2010; GRIFFITHS, 2011).

4.5 Controle de *S. Enteritidis* em camas de aviário usando o bacteriófago SM1

A redução bacteriana pela ação do bacteriófago SM1 foi observada durante 8 horas, havendo uma redução significativa de $3\log_{10}$ de *S. Enteritidis* ($p=0,0016$), conforme apresenta a Figura 9.

Figura 9. Contagem de colônias de *S. Enteritidis* após aplicação do bacteriófago SM1 em cama de aviário.



Redução contagem de colônias de *S. Enteritidis* nas amostras de cama de aviário pela ação do bacteriófago SM1 (quantificadas com o uso do meio diferencial XLD ágar). Fonte: Autora.

Estudos demonstraram a redução das contaminações por *Salmonella* na avicultura, tanto nos cortes de carne de frango, quanto no ambiente de criação das aves, entretanto, nestes casos a administração se dá por meio da água (SUKUMARAN et al., 2015; THUNG et al, 2019; CLAVIJO et al, 2019; VAZ et al, 2020). Apesar do sucesso destas aplicações, ainda não existem trabalhos demonstrando o uso ambiental destes vírus, sendo esta a principal inovação apresentada pelo presente trabalho. A capacidade elevada de inativação bacteriana (99,9%) aponta para a eficiência do bacteriófago utilizado. Outros trabalhos demonstraram perfis de redução bacteriana bastante semelhantes com o apresentado pelo bacteriófago SM1, como por exemplo a redução de $3,9\log_{10}$ e $2,2\log_{10}$ de *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*, respectivamente, em alfaves (SPRICIGO et al, 2013). Grant e colaboradores também encontraram uma redução de $3\log_{10}$ de *S. Typhimurium* em cortes de frango tratados com bacteriófagos ao longo de 17 dias (GRANT et al., 2016). Entretanto, em ambos os trabalhos citados anteriormente os

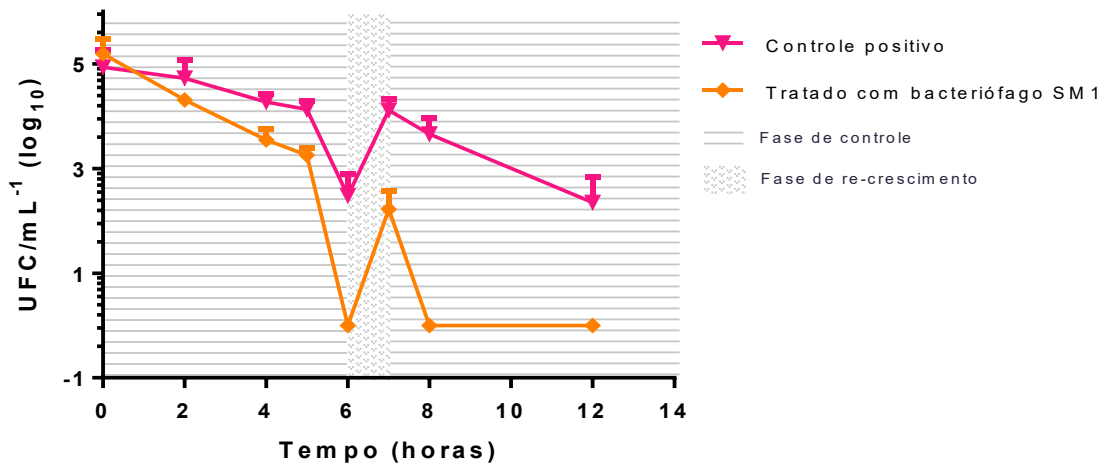
tratamentos fágicos foram compostos por associações de diferentes bacteriófagos, formando o que conhecemos como coquetéis.

Outras configurações de tratamentos utilizam a associação entre bacteriófagos líticos e antimicrobianos químicos. Sukumaran e colaboradores atingiram $5\log_{10}$ de inativação de *S. Typhimurium*, e *S. Enteritidis* associando fagos líticos com cloreto de cetilpiridínio e ácido láurico (SUKUMARAN et al., 2015). Outras associações já se mostraram capazes de aumentar a eficiência de antibióticos como a gentamicina, por exemplo, mesmo em casos em que o composto químico sozinho não seria capaz de controlar a infecção bacteriana (HAGENS et al., 2006; MORRISETTE et al., 2020).

Uma das vantagens apresentadas pelo uso dos bacteriófagos líticos é a impossibilidade de recuperação dos hospedeiros, uma vez que seu método replicativo consiste na produção de proteínas e material genético, levando ao rompimento da célula infectada com a liberação das novas partículas fágicas (LOC-CARRILLO & ABEDON, 2011, JASSIM & LIMOGES, 2013). A capacidade de auto-regulação também pode ser destacada, visto que enquanto houver células hospedeiras o fago poderá continuar sua replicação (ABEDON; THOMAS-ABEDON, 2010). Entretanto este mecanismo não se mostrou suficiente para controlar o ressurgimento das colônias bacterianas algumas horas após o tratamento.

Apesar da capacidade de redução bacteriana apresentada nas primeiras 6h após a aplicação, quando o comportamento destas enterobactérias foi acompanhado por 12h nas camas de aviário tratadas, foi possível observar três fases distintas de comportamento bacteriano, sendo a primeira fase representada pela redução de $3\log_{10}$ na contagem de UFC, entre 2 e 6 horas após o tratamento, a segunda pelo aumento de $1,5\log_{10}$ UFC entre os tempos 6 e 7 horas (evidenciando-se recrescimento bacteriano), enquanto a terceira fase apresentou redução de $3\log_{10}$ UFC na contagem bacteriana entre 8 e 12 horas após a aplicação do bacteriófago SM1. Todos os dados foram comparados com o controle não tratado, como pode ser visto na Figura 10.

Figura 10. Gráfico apresentando o recrescimento bacteriano 7 horas após o tratamento.



Comportamento trifásico da contagem das colônias de *S. Enteritidis* após a aplicação do bacteriófago SM1 em cama de aviário. Fonte: Autora.

De fato, o recrescimento mostra-se um problema mesmo nos tratamentos convencionais com antibióticos, sendo muitas vezes necessárias aplicações subsequentes destes medicamentos. Numerosas espécies bacterianas, como *S. Typhimurium*, podem apresentar células persistentes, causando muitas vezes falhas nos tratamentos com antibióticos, sendo apontadas como uma das causas da falha destes métodos convencionais, principalmente em humanos (HARMS et al, 2016; FISHER et al, 2017; STAPELS et al., 2018). Estudos também demonstraram o impacto da motilidade bacteriana no encontro dos bacteriófagos com seus hospedeiros, sendo que o ambiente pouco úmido das camas de aviário (umidade= 45 ± 10 %) pode ter dificultado os possíveis eventos de infecção viral (BARR et al., 2015; JOINER et al., 2019). Estas condições também reforçam a importância de títulos virais elevados para aplicações ambientais. Apesar da aplicação de um MOI relativamente alto (10:1).

Após a observação do potencial de recrescimento das colônias de *S. Enteritidis*, um novo conjunto experimental foi realizado, com a reaplicação da dose inicial ($1,8 \times 10^6$ UFP mL⁻¹) do bacteriófago SM1. Neste experimento, o controle não tratado apresentou o mesmo comportamento de recrescimento, com redução de $3 \log_{10}$ seguida pelo aumento de $2 \log_{10}$ na contagem bacteriana. Entretanto, a segunda aplicação do bacteriófago SM1 foi capaz de conter o ressurgimento das colônias de *S. Enteritidis*, as quais atingiram um valor indetectável ($p=0,0043$). Assim, a reaplicação do bacteriófago foi capaz de manter a redução de $3 \log_{10}$ atingida 6 horas após o primeiro contato com a cama de aviário (Figura 11), sendo ainda capaz de conter a recontaminação quando desafiada com mais uma dose bacteriana.

Figura 11. Comportamento bacteriano após aplicações sucessivas do bacteriófago SM1.

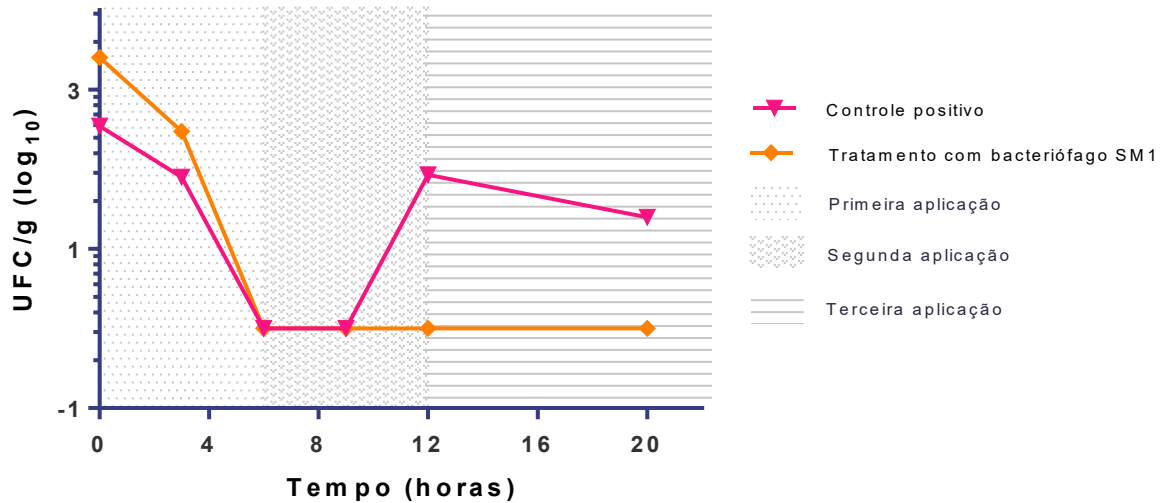


Gráfico demonstrando o controle de *S. Enteritidis* pela aplicação de sucessivas doses do bacteriófago SM1 (6 em 6 horas). Fonte: Autora.

Estes resultados corroboram com os dados obtidos por Ahmadi e colaboradores, nos quais administrações subsequentes de bacteriófagos (3 dias seguidos) foram capazes de eliminar as colônias de *S. Enteritidis*, tendo ainda efeito profilático nas aves (AHMADI et al., 2016). O efeito protetivo contra infecções por *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* também foi observado em estudos de ação combinada com probióticos, ou ainda sendo adicionados à comida das aves (TORO et al., 2005; BORIE et al., 2009; LIM et al., 2012).

Entretanto, apesar dos variados usos dos bacteriófagos para controle de *Salmonella* em diferentes materiais, suas aplicações em matrizes ambientais ainda são bastante escassas e iniciais. Esta constatação confirma a importância dos testes de estabilidade nas camas de aviário após a aplicação do bacteriófago SM1, visto que as camas utilizadas podem ter diferentes destinações e contaminações por *Salmonella* podem persistir por até 6 meses nesta matriz (GU et al., 2019).

4.6 Caracterização físico-química das camas de aviários após aplicação do bacteriófago SM1

As amostras de cama de aviário foram analisadas previamente ao início dos testes de inativação bacteriana, e após a finalização de todas as aplicações fágicas. Os resultados podem ser vistos na tabela 1.

Tabela 1. Médias da caracterização físico-química das amostras de cama de aviário.

Amostra	pH	NH ₃ -N (mg L ⁻¹)	ST (g kg ⁻¹)	SV (g kg ⁻¹)	N (mg kg ⁻¹)	K (mg kg ⁻¹)	P (mg kg ⁻¹)
Cama de frango 1 lote	8.16 ± 0.06	1687 ± 8	892.0809 ± 1.4810	748.5142 ± 3.0068	34450	21316	10183
Cama de frango 3 lotes	7.73 ± 0.04	1711 ± 45	890.7244 ± 23.5467	691.0436 ± 19.1803	36054	22601	11672
Cama de frango 6 lotes	8.43 ± 0.04	2091 ± 20	866.6911 ± 10.8890	678.5302 ± 35.8303	35963	23670	11757
Cama de frango 9 lotes	8.61 ± 0.13	3545 ± 158	880.0166 ± 0.1398	652.4829 ± 2.6538	28883	27992	14279
Cama de frango 9 lotes + casca de ovos	8.57 ± 0.04	3074 ± 3	898.9464 ± 0.1189	529.6680 ± 9.1621	24178	29468	14664
Cama de frango 1 lote + bacteriófagos	8.38 ± 0.11	2468 ± 18	892.1659 ± 1.9487	626.1334 ± 13.8032	32906	23700	12026
Cama de frango 3 lotes + bacteriófagos	7.72 ± 0.01	2274 ± 65	884.5649 ± 6.4378	719.6797 ± 15.4009	38383	21641	12060
Cama de frango 6 lotes + bacteriófagos	7.79 ± 0.07	1887 ± 124	895.1552 ± 1.3328	751.2598 ± 4.6395	35471	18878	10718
Cama de frango 9 lotes + bacteriófagos	8.88 ± 0.01	3838 ± 165	885.7067 ± 0.5839	636.9538 ± 16.0321	24096	25349	15127
Cama de frango 9 lotes + casca de ovos + bacteriófagos	8.55 ± 0.02	3099 ± 84	901.6790 ± 7.9202	556.8441 ± 2.7147	23181	29208	12839

Médias da caracterização físico-química das amostras de cama de aviário antes e após a aplicação do bacteriófago SM1. Fonte: Autora.

Os valores similares mostram a ausência de alterações significativas no perfil físico-químico das camas de aviário geradas pela adição do bacteriófago SM1 à matriz. As alterações leves nos valores de pH podem ser explicadas pela natureza da solução bacteriofágica, visto que o meio de cultivo LB, apresenta pH neutro ($7,0 \pm 0,2$), além da composição viral, sendo os bacteriófagos constituídos por conjuntos estruturais e funcionais de proteínas e ácidos nucleicos (SKURNIK et al., 2007). Apesar de sua composição rica em nitrogênio, os teores deste elemento, bem como os teores de potássio e fósforo, não apresentaram alterações significativas ($p > 0,05$) após a adição do bacteriófago SM1 à matriz.

5.CONCLUSÃO

O bacteriófago SM1 (ordem *Siphoviridae*), foi estável e não citotóxico em camas de diferentes lotes de produção de aves, controlando significativamente *S. Enteritidis* a partir de duas aplicações consecutivas à 0h e 6h pelo método de gotejamento.

Os resultados são promissores e incentivam o escalonamento dos testes em escala real, à campo técnico em aviários, considerando a extrema importância de garantir a eficiência dessa ferramenta de controle biológico e desenvolver métodos para evitar o recrescimento bacteriano e/ou bactérias resilientes do processo de tratamento.

6. REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F. M. The livestock reservoir for antimicrobial resistance: A personal view on changing patterns of risks, effects of interventions and the way forward. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 370, n. 1670, 2015.

ABEDON, S.; THOMAS-ABEDON, C. Phage Therapy Pharmacology. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 28–47, 1 jan. 2010.

ABPA, A. B. DE P. ANIMAL. **Relatório Anual**. [s.l.: s.n.].

ACKERMANN, H. W. **5500 Phages examined in the electron microscope** **Archives of Virology**, fev. 2007.

AHMADI, M. *et al.* Prophylactic bacteriophage administration more effective than post-infection administration in reducing *Salmonella enterica* serovar enteritidis shedding in Quail. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. AUG, 9 ago. 2016.

ANDINO, A.; HANNING, I. *Salmonella enterica*: Survival, Colonization, and Virulence Differences among Serovars. 2015.

ANTUNES, P. *et al.* **Salmonellosis: The role of poultry meat** **Clinical Microbiology and Infection** Elsevier B.V., , 1 fev. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.004>>. Acesso em: 9 abr. 2021

APHA, A. P. H. A. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater Part 1000 Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. n. 22nd edition, 2012.

ATANASOVA, N. S. *et al.* Global network of specific virus-host interactions in hypersaline environments. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 426–440, fev. 2012.

BALTER, M. **Evolution on life's fringes** **Science**, 15 set. 2000.

BARR, J. J. *et al.* Subdiffusive motion of bacteriophage in mucosal surfaces increases the frequency of bacterial encounters. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 44, p. 13675–13680, 3 nov. 2015.

BERKES, F.; DOUBLEDAY, N. C.; CUMMING, G. S. Aldo Leopold's land health from a resilience point of view: self-renewal capacity of social-ecological systems. **EcoHealth**, v. 9, n. 3, p. 278–287, set. 2012.

BOLAN, N. S. *et al.* **Uses and management of poultry litter** **World's Poultry Science Journal** Taylor & Francis, dez. 2010. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1017/S0043933910000656>>. Acesso em: 8 fev. 2021

BORIE, C. *et al.* El tratamiento por aerosol con bacteriófagos y exclusión competitiva reduce la infección con *Salmonella* Enteritidis en pollos. **Avian Diseases**, v. 53, n. 2, p. 250–254, jun. 2009.

BRADEN, C. R. **Salmonella enterica serotype enteritidis and eggs: A national epidemic in the United States** *Clinical Infectious Diseases* Oxford Academic, , 15 ago. 2006. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/505973>>. Acesso em: 9 abr. 2021

BUTAYE, P. *et al.* **The clonal spread of multidrug-resistant non-typhi Salmonella serotypes** *Microbes and Infection* Microbes Infect, , jun. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16714135/>>. Acesso em: 9 abr. 2021

CALERO-CÁCERES, W.; LUIS, J. Antibiotic resistance genes in bacteriophages from diverse marine habitats. **Science of the Total Environment**, v. 654, p. 452–455, 2019.

CASEY, A.; COFFEY, A.; MCAULIFFE, O. Genetics and Genomics of Bacteriophages. *In: Bacteriophages*. [s.l.] Springer International Publishing, 2017. p. 1–26.

CDC, C. FOR D. C. AND P. **About Antibiotic Resistance | Antibiotic/Antimicrobial Resistance | CDC**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>>. Acesso em: 9 fev. 2020.

CENENS, W. *et al.* Phage–host interactions during pseudolysogeny. **Bacteriophage**, v. 3, n. 1, p. e25029, jan. 2013.

CHEN, H. M. *et al.* **Nontyphoid Salmonella infection: Microbiology, clinical features, and antimicrobial therapy** *Pediatrics and Neonatology* *Pediatr Neonatol*, , jun. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23597525/>>. Acesso em: 9 abr. 2021

CLOKIE, M. R. J. *et al.* Phages in nature. **Bacteriophage**, v. 1, n. 1, p. 31–45, jan. 2011.

D'HERELLE, F. The Bacteriophage and its Behaviour. **Nature**, v. 118, n. 2962, p. 183–185, ago. 1926.

DIXON, M. A.; DAR, O. A.; HEYMANN, D. L. One health: Emerging infectious diseases: Opportunities at the human-animal-environment interface. **Veterinary Record**, v. 174, n. 22, p. 546–551, 31 maio 2014.

EFSA, E. F. S. A. *et al.* The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. **EFSA Journal**, v. 15, n. 12, p. 5077, 1 dez. 2017.

EL-DOUGDOUG, N. K. *et al.* Control of Salmonella Newport on cherry tomato using a cocktail of lytic bacteriophages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 293, p. 60–71, 16 mar. 2019.

ENTICKNAP, J. J. *et al.* Microbial diversity associated with odor modification for production of fertilizers from chicken litter. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 6, p. 4105–4114, jun. 2006.

FAO, F. AND A. O. **Production | Gateway to poultry production and products | Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <<http://www.fao.org/poultry-production-products/production/en/>>. Acesso em: 18 mar. 2021.

FISHER, R. A.; GOLLAN, B.; HELAINE, S. **Persistent bacterial infections and persister cells** *Nature Reviews Microbiology* Nature Publishing Group, , 1 ago. 2017.

FOOD SAFETY AUTHORITY, E. *et al.* The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. **EFSA Journal**, v. 15, n. 12, p. 5077, 1 dez. 2017.

FORTIER, L. C.; SEKULOVIC, O. Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. **Virulence**, v. 4, n. 5, p. 354–365, 2013.

FUHRMAN, J. A. **Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects** *Nature*, 10 jun. 1999.

GAO, Y.; XU, C. Synthesis of dimethyl carbonate over waste eggshell catalyst. **Catalysis Today**, v. 190, n. 1, p. 107–111, 1 ago. 2012.

GARIN-FERNANDEZ, A.; WICHELS, A. Looking for the hidden: Characterization of lysogenic phages in potential pathogenic *Vibrio* species from the North Sea. **Marine Genomics**, p. 100725, 19 nov. 2019.

GRIFFITHS, N. **Best practice guidelines for using poultry litter on pastures**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.dpi.nsw.gov.au/publications>. Acesso em: 8 fev. 2021.

GU, G. *et al.* Diversity and Dynamics of Salmonella enterica in Water Sources, Poultry Litters, and Field Soils Amended With Poultry Litter in a Major Agricultural Area of Virginia. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 17 dez. 2019.

HAGENS, S.; HABEL, A.; BLÄSI, U. Augmentation of the antimicrobial efficacy of antibiotics by filamentous phage. **Microbial Drug Resistance**, v. 12, n. 3, p. 164–168, set. 2006.

HARMS, A.; MAISONNEUVE, E.; GERDES, K. Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. **Science**, v. 354, n. 6318, p. 1390–1396, 16 dez. 2016.

HENDRIKSEN, R. S. *et al.* Global monitoring of salmonella serovar distribution from the world health organization global foodborne infections network country data bank: Results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 8, p. 887–900, 1 ago. 2011.

ISO - ISO 10705-1:1995 -. Disponível em: <<https://www.iso.org/standard/18794.html>>. Acesso em: 5 out. 2020.

ISO - ISO 6579-1:2017 - Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. Disponível em: <<https://www.iso.org/standard/56712.html>>. Acesso em: 8 set. 2021.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S. *et al.* Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 165, n. 7, p. 526–530, 2014.

JANCZUK, M.; NIEDZIÓŁKA-JÖNSSON, J.; SZOT-KARPIŃSKA, K. Bacteriophages in electrochemistry: A review. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 779, p. 207–219, 15 out. 2016.

JASSIM, S. A. A.; LIMOGES, R. G. **Impact of external forces on cyanophage-host interactions in aquatic ecosystems** **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, out. 2013.

JHAMB, S. Biopreservation of Food Using Bacteriocins, Bacteriophages and Endolysins. **Bombay Tech**, v. 64, n. 1, p. 9–21, 2014.

JOINER, K. L. *et al.* Impact of bacteria motility in the encounter rates with bacteriophage in mucus. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 1 dez. 2019.

JONES, T. F. *et al.* Salmonellosis outcomes differ substantially by serotype. **Journal of Infectious Diseases**, v. 198, n. 1, p. 109–114, 1 jul. 2008.

KARESH, W. B. *et al.* **Ecology of zoonoses: Natural and unnatural histories** **The Lancet** Lancet Publishing Group, , 1 dez. 2012.

KUTATELADZE, M.; ADAMIA, R. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 12, p. 591–595, dez. 2010.

KUTTER, E. *et al.* **Phage Therapy in Clinical Practice: Treatment of Human Infections** *Current Pharmaceutical Biotechnology*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.biochimpharm.ge>. Acesso em: 4 fev. 2020.

LACA, AMANDA; LACA, ADRIANA; DÍAZ, M. **Eggshell waste as catalyst: A review** *Journal of Environmental Management* Academic Press, , 15 jul. 2017.

LI, H.-Y. *et al.* A qualitative study of zoonotic risk factors among rural communities in southern China. **International Health**, v. 12, p. 77–85, 2020.

LIM, T. H. *et al.* Use of bacteriophage for biological control of Salmonella Enteritidis infection in chicken. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 3, p. 1173–1178, dez. 2012.

LOC-CARRILLO, C.; ABEDON, S. T. Pros and cons of phage therapy. **Bacteriophage**, v. 1, n. 2, p. 111–114, mar. 2011.

LURIA, S. E. **Bacteriophage: An essay on virus reproduction** *Science*, 1950.

MARTELLI, F.; DAVIES, R. H. Salmonella serovars isolated from table eggs: An overview. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 745–754, mar. 2012.

MARTIN, M. J.; THOTTATHIL, S. E.; NEWMAN, T. B. **Antibiotics overuse in animal agriculture: A call to action for health care providers** *American Journal of Public Health* American Public Health Association Inc., , 1 dez. 2015. Disponível em: </pmc/articles/PMC4638249/>. Acesso em: 9 abr. 2021

MCEWEN, S. A.; COLLIGNON, P. J. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *In: Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals*. [s.l.] American Society of Microbiology, 2018. v. 6p. 521–547.

MIZOGUCHI, K. *et al.* Coevolution of Bacteriophage PP01 and Escherichia coli O157:H7 in Continuous Culture. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, v. 69, n. 1, p. 170–176, 2003.

MORRISETTE, T. *et al.* **Bacteriophage Therapeutics: A Primer for Clinicians on Phage-Antibiotic Combinations** *Pharmacotherapy* Pharmacotherapy Publications Inc., , 1 fev. 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/phar.2358>. Acesso em: 9 abr. 2021

NEWELL, D. G. *et al.* Food-borne diseases - The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, n. SUPPL. 1, maio 2010.

NGUYEN-VIET, H. et al. A one health perspective for integrated human and animal sanitation, nutrient recycling and climate change. *One Health: the theory and practice of integrated health approaches*, p. 157–169, 8 out. 2020.

OH, J. H.; PARK, M. K. **Recent trends in Salmonella outbreaks and emerging technology for biocontrol of Salmonella using phages in foods: A review** *Journal of Microbiology and Biotechnology* Korean Society for Microbiolog and Biotechnology, , 1 dez. 2017. Disponível em: <<http://www.jmb.or.kr/journal/view.html?doi=10.4014/jmb.1710.10049>>. Acesso em: 9 abr. 2021

OLIVAL, K. J. *et al.* Host and viral traits predict zoonotic spillover from mammals. *Nature*, v. 546, n. 7660, p. 646–650, 29 jun. 2017.

OLIVEIRA, D. A.; BENELLI, P.; AMANTE, E. R. A literature review on adding value to solid residues: Egg shells. *Journal of Cleaner Production*, v. 46, p. 42–47, 1 maio 2013.

PARRY, C. M.; THRELFALL, E. J. **Antimicrobial resistance in typhoidal and nontyphoidal salmonellae** *Current Opinion in Infectious Diseases* Curr Opin Infect Dis, , out. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18725804/>>. Acesso em: 9 abr. 2021

PATEL, T. *et al.* Drug residues in poultry meat: A literature review of commonly used veterinary antibacterials and anthelmintics used in poultry. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v. 41, n. 6, p. 761–789, 1 dez. 2018.

Principles of Molecular Virology - 6th Edition. Disponível em: <<https://www.elsevier.com/books/principles-of-molecular-virology/cann/978-0-12-801946-7>>. Acesso em: 9 abr. 2021.

RITCHIE, H.; ROSER, M. **Meat and Dairy Production - Our World in Data.** Disponível em: <<https://ourworldindata.org/meat-production>>. Acesso em: 9 abr. 2021.

ROHWER, F. **Global phage diversity** Cell Cell Press, , 18 abr. 2003.

RYAN, M. P.; O'DWYER, J.; ADLEY, C. C. **Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen Salmonella** *BioMed Research International* Hindawi Limited, , 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31111111/>>. Acesso em: 9 abr. 2021

RYU, S. *et al.* **One health perspectives on emerging public health threats** *Journal of Preventive Medicine and Public Health* Korean Society for Preventive Medicine, , 1 nov. 2017.

SÄDE, E.; MURROS, A.; BJÖRKROTH, J. Predominant enterobacteria on modified-atmosphere packaged meat and poultry. **Food Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 252–258, 1 jun. 2013.

SEIFFERT, S. N. *et al.* Extended-spectrum cephalosporin-resistant gram-negative organisms in livestock: An emerging problem for human health? **Drug Resistance Updates**, v. 16, n. 1–2, p. 22–45, fev. 2013.

SINGH, N.; ANAND, S. Enterobacteriaceae. *In*: **Reference Module in Food Science**. [s.l.] Elsevier, 2020. .

SKURNIK, M.; PAJUNEN, M.; KILJUNEN, S. **Biotechnological challenges of phage therapy** *Biotechnology Letters* Springer, , 16 jul. 2007.

STAPELS, D. A. C. *et al.* Salmonella persists undermine host immune defenses during antibiotic treatment. **Science**, v. 362, n. 6419, p. 1156–1160, 7 dez. 2018.

TORO, H. *et al.* Use of bacteriophages in combination with competitive exclusion to reduce Salmonella from infected chickens. **Avian Diseases**, v. 49, n. 1, p. 118–124, 2005.

VERHEUST, C. . *et al.* **Contained Use of Bacteriophages: Risk Assessment and Biosafety Recommendations**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.absa.org>. Acesso em: 4 fev. 2020.

WHO, W. H. O. **Critically Important Antimicrobials for Human Medicine 3rd Revision 2011**. [s.l: s.n.].

____. **The Control of Neglected Zoonotic Diseases From advocacy to action**. [s.l: s.n.].

WOOLHOUSE, M. E. J.; GOWTAGE-SEQUERIA, S. Host range and emerging and reemerging pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 12, p. 1842–1847, 2005.

WOOLSTON, J. *et al.* Bacteriophages lytic for Salmonella rapidly reduce Salmonella contamination on glass and stainless steel surfaces . **Bacteriophage**, v. 3, n. 3, p. e25697, 11 jul. 2013.

ZHOU, P. *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 270–273, 12 mar. 2020.

7 APÊNDICE 1 – MATERIAIS COMPLEMENTARES

7.1 Publicações e participação em eventos

7.1.1 Artigos completos publicados em periódicos

- **Co-contamination of food products from family farms in an environmental disaster area in Southeast Brazil with pathogenic bacteria and enteric viruses.**

DE CASTRO CARVALHO, S. V.; **ROGOVSKI, P.**; CADAMURO, R. D.; VIANCELLI, A.; MICHELON, W.; DOS REIS, D. A.; SANTANA DASCHAGAS, I. A.; ASSENÇO, R.; DA SILVA LANNA, M. C.; TREICHEL, H.; FONGARO, G.

In the present study, we evaluated the degree of contamination of fresh vegetables, cheeses and jellies from disaster area in Brazil with bacteria and enteric viruses. Food samples (n = 350) were tested for *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus* spp., and enteric viruses (rotavirus A (RVA), human adenovirus (HAdV), hepatitis A virus (HAV), and human norovirus (HNoV)). *E. coli* was present in 56% of the samples, *Salmonella* spp. was present in 14% of the samples, *L. monocytogenes* and *Staphylococcus* spp. (coagulase-positive) were present in 36% of the samples. The enteric viruses RVA and HAdV were detected in cheeses and vegetables.

ARCHIVES OF VIROLOGY, v. 3, p. 122, 2019.

- **A review on alternative bioprocesses for removal of emerging contaminants.**

VIANCELLI, A.; MICHELON, W.; **ROGOVSKI, P.**; CADAMURO, R. D.; DESOUZA, E. B.; FONGARO, G.; CAMARGO, A. F.; STEFANSKI, F.S.; VENTURIN, B.; SCAPINI, T.; BONATTO, C.; PRECZESKI, K. P.; KLANOVICZ, N.; DE OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.

Emerging contaminants (ECs) include endocrine-disrupting compounds, pharmaceuticals (lipid regulators, antibiotics, diuretics, non-steroid anti-inflammatory drugs, stimulant drugs, antiseptics, analgesic, beta blockers), detergents, disinfectants, and personal care products. The residues from these compounds have become a concerning because of their bioactive presence on environmental matrices, especially water bodies. The development of technologies, aiming

the secure and efficient removal of these compounds from the environment or event to remove them before they achieve the environment, is necessary. In these context, the present review is about promising eco-friendly, low-cost and specially applied, including biological processes using microalgae, bacteria, enzymes produced by fungi, and adsorbent materials such as those recycled from other processes waste. The processes where revised considering the removal mechanism and the efficiency rate.

BIOPROCESS AND BIOSYSTEMS ENGINEERING, v. 1, p. 1-13, 2020.

- **Extremophile Microbial Communities and Enzymes for Bioenergetic Application Based on Multi-Omics Tools**

FONGARO, G; MAIA, G. A.; **ROGOVSKI, P.**; CADAMURO, R. D.; LOPES, J. C.; MOREIRA, R. S.; CAMARGO, A. F.; SCAPINI, T.; STEFANSKI, F.S.; BONATTO, C.; SOUZA, D. S. M.; STOCO, P. H.; DUARTE, R. T. D.; DACRUZ, A. C. C.; WAGNER, G.; TREICHEL, H.

Genomic and proteomic advances in extremophile microorganism studies are increasingly demonstrating their ability to produce a variety of enzymes capable of converting biomass into bioenergy. Such microorganisms are found in environments with nutritional restrictions, anaerobic environments, high salinity, varying pH conditions and extreme natural environments such as hydrothermal vents, soda lakes, and Antarctic sediments. As extremophile microorganisms and their enzymes are found in widely disparate locations, they generate new possibilities and opportunities to explore biotechnological prospecting, including biofuels (biogas, hydrogen and ethanol) with an aim toward using multi-omics tools that shed light on biotechnological breakthroughs.

CURRENT GENOMICS, v. 21, p. 240-252, 2020.

- **Hepatitis E Virus in Manure and Its Removal by Psychrophilic anaerobic Biodigestion in Intensive Production Farms, Santa Catarina, Brazil, 2018-2019**

SOUZA, D. S. M.; TÁPPARO, D. C.; **ROGOVSKI, P.**; CADAMURO, R. D.; DE SOUZA, E. B.; DA SILVA, R.; DEGENHARDT, R.; LINDNER, J. D.; VIANCELLI, A.; MICHELON, W.; KUNZ, A.; TREICHEL, H.; HERNÁNDEZ, M.; RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; FONGARO, G.

Hepatitis E virus (HEV) is an important enteric agent that can circulate in swine; it is excreted in manure, and of zoonotic interest. The present study investigated, by RT-qPCR, the circulation of HEV in swine manure from different types of pig farms (maternity, nursery, and grow-finish farms) in Santa Catarina State, the major pig production area of Brazil, and also evaluated the HEV removal efficiency of psychrophilic anaerobic biodigesters (PABs). While HEV was consistently detected in manure from grow-finish pig farms ($>4 \log_{10}$ HEV genome copies (GC) L⁻¹), the virus was not detected in manure from maternity and nursery farms. These findings suggest a potential high biosafety status during primary-swine production, with a subsequent contamination in grow-finish production. The anaerobic biodigestion process reduced more than $2 \log_{10}$ HEV GC in the processed swine manure. However, the virus concentration in final effluent remained high, with an average value of $3.85 \log_{10}$ HEV GC L⁻¹. Consequently, our results demonstrate that PABs can be a robust tool for effective inactivation of HEV, while reinforcing the need for sanitary surveillance and legislation of swine manure-derived biofertilizers, to avoid the spread of zoonotic enteric pathogens such as HEV.

BIOPROCESS AND BIOSYSTEMS ENGINEERING, v. 1, p. 1-13, 2020.

- **Nutritional, energy and sanitary aspects of swine manure and carcass co-digestion.**

TAPPARO, D. C.; **ROGOVSKI, P.**; CADAMURO, R. D.; SOUZA, D. S. M.; BONATTO, C.; CAMARGO, A. F.; SCAPINI, T.; STEFANSKI, F. S.; AMARAL, A.; KUNZ, A.; HERNANDEZ, M.; TREICHEL, H.; RODRIGUEZ-LAZARO, D.; FONGARO, G.

Renewable energy can assist the management of the effects of population growth and rapid economic development on the sustainability of animal husbandry. The primary aim of renewable energy is to minimize the use of fossil fuels via the creation of environmentally friendly energy products from depleted fossil fuels. Digesters that treat swine manure are extensively used in treatment systems; and inclusion of swine carcasses can increase the organic loading rate (OLR) thereby improving biogas yield and productivity on farms. However, the characteristics of the components including animal residues, proteins, lipids, remains of undigested feed items, antimicrobial drug residues, pathogenic microorganisms and nutrient contents, are complex and diverse. It is therefore necessary to manage the anaerobic process stability and digestate purification for subsequent use as fertilizer. Efficient methane recovery

from residues rich in lipids is difficult because such residues are only slowly biodegradable. Pretreatment can promote solubilization of lipids and accelerate anaerobic digestion, and pretreatments can process the swine carcass before its introduction onto biodigesters. This review presents an overview of the anaerobic digestion of swine manure and carcasses. We analyze the characteristics of these residues, and we identify strategies to enhance biogas yield and process stability. We consider energy potential, co-digestion of swine manure and carcasses, physical, chemical, and biological pretreatment of biomass, sanitary aspects of swine manure and co-digestates and their recycling as fertilizers.

FRONTIERS IN BIOENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY, v. 8, p. 333, 2020.

- **The presence of SARS-CoV-2 rna in human sewage in santa catarina, brazil, november 2019**

FONGARO, G.; STOCO, P. H.; SOUZA, D. S. M.; GRISARD, E. C.; MAGRI, M. E.; **ROGOVSKI, P.**; SCHÖRNER, M. A.; BARAZZETTI, F. H.; CHRISTOFF, A. P.; OLIVEIRA, L. F. V.; BAZZO, M. L.; WAGNER, G.; HERNÁNDEZ, M.; RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.

Human sewage from Florianopolis (Santa Catarina, Brazil) was analyzed for severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV2) from October 2019 until March 2020. Twenty five ml of sewage samples were clarified and viruses concentrated using a glycine buffer method coupled with polyethylene glycol precipitation, and viral RNA extracted using a commercial kit. SARS-CoV-2 RNA was detected by RT-qPCR using oligonucleotides targeting N1, S and two RdRp regions. The results of all positive samples were further confirmed by a different RT-qPCR system in an independent laboratory. S and RdRp amplicons were sequenced to confirm identity with SARS-CoV-2. Genome sequencing was performed using two strategies; a sequence-independent single-primer amplification (SISPA) approach, and by direct metagenomics using Illumina's NGS. SARS-CoV-2 RNA was detected on 27th November 2019 ($5.49 \pm 0.02 \log_{10}$ SARS-CoV-2 genome copies (GC) L^{-1}), detection being confirmed by an independent laboratory and genome sequencing analysis. The samples in the subsequent three events were positive by all RT-qPCR assays; these positive results were also confirmed by an independent laboratory. The average load was $5.83 \pm 0.12 \log_{10}$ SARS-CoV-2 GC L^{-1} , ranging from $5.49 \pm 0.02 \log_{10}$ GC L^{-1} (27th November 2019) to $6.68 \pm 0.02 \log_{10}$ GC L^{-1} (4th March 2020). Our findings demonstrate that SARS-CoV-2 was likely

circulating undetected in the community in Brazil since November 2019, earlier than the first reported case in the Americas (21st January 2020).

SCIENCE OF TOTAL ENVIRONMENT, v. 778, 2021.

7.1.2 Capítulos de livros

- **POTENCIALIDADES BRASILEIRAS NA INTEGRAÇÃO DE REUSO DE ÁGUA E PRODUÇÃO BIOENERGÉTICA NA VISÃO DE ECONOMIA CIRCULAR. Inovação, Gestão e Sustentabilidade 2**

KNOBLAUCH, P. M.; DALASTRA, C.; STEFANSKI, F. S.; ZANIVAN, J.; KLANOVICZ, N.; KUBENECK, S.; ROSA, G. A.; REIS, P.; CAMARGO, A. F.; SCAPINI, T.; BONATTO, C.; LANNA, M. C. S.; **ROGOVSKI, P.**; CADAMURO, R. D.; MICHELON, W.; VIANCELLI, A.; TREICHEL, H.; FONGARO, G.

Atena Editora, 2019, v.1, p. 188-203.

- **A SAÚDE DA ÁGUA MEDIADA PELA REDUÇÃO DE CONTAMINANTES DO AMBIENTE AQUÁTICO E RECIRCULAÇÃO HÍDRICA. A saúde da água mediada pela redução de contaminantes do ambiente aquático e recirculação hídrica**

CADAMURO, R. D.; **ROGOVSKI, P.**; BONATTO, C.; SOUZA, E. B.; SILVA, R.; ALVES, M. S.; SOUZA, D. S. M.; MICHELON, W.; VIANCELLI, A.; LANNA, M. C. S.; TREICHEL, H.; FONGARO, G.

São Paulo: Liber Ars. 2020, v. , p. 11.

- **WASTEWATER TREATMENT FOR BIOENERGY PURPOSES USING A METAPROTEOMIC APPROACH. Wastewater Treatment**

TÁPPARO, D. C.; RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; HERNÁNDEZ, M; CAMARGO, A. F.; BONATTO, C.; MAIA, G.; **ROGOVSKI, P.**; DADAMURO, R. D.; SORATTO, T. A. T.; SCAPINI, T.; STOCO, P. H.; WAGNER, G.; KUNZ, A.; MICHELON, W.; VIANCELLI, A.; TREICHEL, H.; FONGARO, G.

Elsevier, 2021, 1ed., v.1, p. 253-278.

7.1.3 Resumos publicados em anais de eventos

- **ENTERIC VIRUSES DETECTION IN ENVIRONMENTAL WATER FROM MIDWEST-BRAZIL AFTER ONE DECADE AFTER ATTENUATED VACCINE AGAINST ROTAVIRUS INTRODUCTION.**

CADAMURO, R. D.; **ROGOVSKI, P.**; SOUZA, E. B.; SILVA, R.; BONATTO, C.; TREICHEL, H.; FONGARO, G.; MACHADO, A. M.

XXX Congresso Brasileiro de Virologia, 2019, Cuiabá.

- **BRAZILIAN CATTLE BACTERIOPHAGES ISOLATION**

SILVA, R.; **ROGOVSKI, P.**; CADAMURO, R. D.; SOUZA, E. B.; ALVES, M. S.; SOUZA, D. S. M.; LANNA, M. C. S.; MICHELON, W.; VIANCELLI, A.

XXX Congresso Brasileiro de Virologia, 2019.

- **BACTERIOPHAGES ISOLATION AGAINST KLEBSIELLA PNEUMONIAE AND PROTEUS MIRABILIS FOR ENVIRONMENTAL APPLICATION.**

CADAMURO, R. D.; **ROGOVSKI, P.**; SILVA, R.; SOUZA, E. B.; ALVES, M. S.; SOUZA, D. S. M.; LANNA, M. C. S.; MICHELON, W.; VIANCELLI, A.; FONGARO, G.

XXX Congresso Brasileiro de Virologia, 2019.

- **VIRUSES AND BACTERIA ADSORPTION FROM SWINE WASTEWATER USING MORINGA OLEIFERA SEED SHELL.**

SOUZA, E. B.; SOUZA, D. S. M.; **ROGOVSKI, P.**; CADAMURO, R. D.; SILVA, R.; ALVES, M. S.; FONGARO, G.; LANNA, M. C. S.

XXX Congresso Brasileiro de Virologia, 2019, Cuiabá.

- **VIRAL AND BACTERIAL DECAY IN OYSTER TISSUES UNDERGO TO RELAYING POST-HARVEST TREATMENT IN BRAZIL: A PRELIMINARY STUDY.**

SOUZA, D. S. M.; SILVA, V. C.; SILVA, M. A.; LANZZARIN, P. K.; DAMO, A. C. M.; **ROGOVSKI, P.**; CADAMURO, R. D.; SAVI, B. P.; SOUZA, E. B.; SILVA, R.; MIOTTO, M.; FONGARO, G.; LINDNER, J. D.

XXXI Congresso Brasileiro de Virologia, 2020.

- **DETECTION AND METAGENOMIC OF SARS-COV-2 IN HUMAN SEWAGE IN SANTA CATARINA, BRAZIL, NOVEMBER 2019.**

FONGARO, G.; STOCO, P. H.; SOUZA, D. S. M.; GRISARD, E. C. ; MAGRI, M. E. ; **ROGOVSKI, P.** ; SANTOS, M. A. ; BARAZZETTI, F. H. ; OLIVEIRA, L. F. V. ; BAZZO, M. L. ; WAGNER, G. ; HERNANDEZ, M. ; RODRIGUEZ-LAZARO, D.
XXXI Congresso Brasileiro de Virologia, 2020.

- **VIRALL BRAZIL: BRAZILIAN VIROLOGY NETWORK FOCUSED ON ONE HEALTH APPROACH.**

SILVA, R.; PAVI, C. P.; ZUCHI, I. D. P.; SAVI, B. P.; SOUZA, E. B.; CADAMURO, R. D.; **ROGOVSKI, P.**; GUTERRES, I. Z.; REIS, J. G.; SILVA, V. C.; SILVA, S. S. F.; SOUZA, D. S. M.; CRUZ, A. C. C.; SILVA, I. T.; FONGARO, G.
XXXI Congresso Brasileiro de Virologia, 2020.

- **FRESHWATER ENVIRONMENTS ABOVE THE GUARANI AQUIFER.**

CADAMURO, R. D.; **ROGOVSKI, P.**; SILVA, R.; SOUZA, E. B.; SOUZA, D. S. M.; VIANCELLI, A.; MICHELON, W.; FONSECA, T. G.; MASS, A. P.; KROHN, D. M. A.; PETER, N. R. W.; SCHNEIDER, T. M.; FONGARO, G.
XXXI Congresso Brasileiro de Virologia, 2020.

- **SALMONELLA ENTERITIDIS CONTROL IN POULTRY LITTER MEDIATED BY LITIC BACTERIOPHAGE.**

ROGOVSKI, P.; SILVA, R.; CADAMURO, R. D.; SOUZA, E. B.; SAVI, B. P.; VIANCELLI, A.; TREICHEL, H.; RODRIGUEZ-LAZARO, D.; FONGARO, G.
XXXI Congresso Brasileiro de Virologia, 2020

7.1.4 Curso de curta duração ministrado

- **BIOLOGIA E BIOTECNOLOGIA VIRAL**

FONGARO, G.; CADAMURO, R. D.; **ROGOVSKI, P.**; SILVA, R.; SOUZA, E. B.; ZUCHI, I. D. P.
Semana acadêmica da biologia, UFSC (2019)

7.2 Coorientação de trabalho de conclusão de curso

- **PROSPECÇÃO DE BACTERIÓFAGOS DA PECUÁRIA BRASILEIRA**

Aluno: Raphael Silva

Curso: Ciências biológicas

Instituição: UFSC

Resumo: Dentre os principais produtores e exportadores mundiais de carne encontra-se o Brasil. Junto disso é observado um aumento no número de casos de surtos de doenças transmitidas por alimentos, entre os principais agentes etiológicos estão as bactérias da família Enterobacteriaceae, caracterizadas por serem Gram-negativas, não formadoras de esporos, anaeróbios facultativos, fermentadores de lactose e presentes no intestino de mamíferos. Devido ao fato destas bactérias estarem apresentando cada vez mais resistência aos antibióticos, se torna necessário o desenvolvimento de novas alternativas para o combate a esses microrganismos. Os bacteriófagos são vírus de procariotos, o seu conhecimento data do início do século XX, porém com o desenvolvimento dos antibióticos seu estudo ficou cada vez mais em segundo plano. É estimado que menos de 0,0002% da diversidade global de bacteriófagos foi amostrada. Entretanto, apesar dos fagos serem as entidades biológicas mais abundantes e diversas no planeta, pouco se sabe sobre este universo. Assim, a presente proposta visa o isolamento e caracterização de bacteriófagos a partir de amostras ambientais (águas e efluentes pecuários) visando o potencial biocontrole de bactérias entéricas. Uma alternativa ao uso dos antibióticos são os coquetéis bacteriofágicos, o qual deve conter diversas espécies de bacteriófagos com capacidade lítica a um amplo espectro dessas bactérias. Este trabalho tem como objetivo buscar por bacteriófagos que possuam capacidade lítica, compondo assim um biobanco, a fim de se adquirir um coquetel contra Enterobactérias para ser aplicado na agroindústria, prezando pela saúde única. Para isso, foram analisadas diferentes amostras de dejetos de fazendas e granjas produtoras de aves, suínos e bovinos provenientes do Oeste de Santa Catarina. Foi utilizado o método de duplo ágar para o isolamento dos bacteriófagos, o título viral foi determinado pelo cálculo de Unidades Formadoras de Placa, e por fim a caracterização morfológica será feita através de microscopia eletrônica com auxílio do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina. Até então bacteriófagos para as bactérias *Salmonella enterica*, *Enterobacter aerogenes* e *Klebsiella pneumoniae* já foram isolados.

7.3 Artigos redigidos com base na presente dissertação

7.3.1 The (old and forgotten) force awakens: application of bacteriophages in food safety and environmental monitoring

Paula Rogovski¹, Rafael Dorighello Cadamuro¹, Charline Bonatto^{2,3}, Aline Viancelli⁴, William Michelin⁴, Elmahdy M. Elmahdy⁵, Helen Treichel³, David Rodríguez-Lázaro^{6*} and Gislaine Fongaro^{1*}

¹ Laboratory of Applied Virology, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil; paularogovski@gmail.com (P.R.), rafaelcada@hotmail.com (R.D.C.), gislaine.fongaro@ufsc.br (G.F.)

² Department of Chemical and Food Engineering, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil; charli_bonatto@outlook.com

³ Federal University of Fronteira Sul (UFFS), Laboratory of Microbiology and Bioprocesses, Erechim, RS, Brazil; helentreichel@gmail.com

⁴ Contested University (PMPECSA), Concórdia, Santa Catarina, Brazil; alinevortoli@gmail.com (A.V.), william@unc.br (W.M.)

⁵ Environmental Virology Laboratory, Water pollution Research department, Environmental Research Division, National Research Centre, Dokki, Giza, 12622, Egypt; mahdynrc@yahoo.com

⁶ Division of Microbiology, Department of Biotechnology and Food Science, Universidad de Burgos, Burgos, Spain; drlazaro@ubu.es

* Correspondence: drlazaro@ubu.es (D.R-L.); gislaine.fongaro@ufsc.br (G.F.)

Abstract: Bacteriophages are bacterial viruses and are the most abundant biological forms on Earth. However, their application as a treatment against bacterial pathogens has been little exploited. Each bacterial species possesses one or multiple bacteriophages and the specificity of phage infection makes them a promising alternative for food safety, since they can be applied as a biotechnological tool against foodborne pathogenic bacteria, including those resistant to antibiotics. This application can be either directly into the foods as an ingredient or into food-related environments as biocontrol agents of biofilm formation. In addition, bacteriophages can be used as a novel approach for microbial source-tracking and as fecal indicators. Consequently, the application of phages can contribute to bacterial control in human, animal and environmental health, decreasing risk of disease linked to the spread of bacterial pathogens. The present review will focus on the most important areas where phages have been applied, not only as food disinfection alternatives but also as food and environmental biomarkers.

7.3.2 Artigo Submetido: Foods FI: *Salmonella enterica* serovar Enteritidis control in poultry litter mediated by lytic bacteriophage isolated from swine manure

Paula Rogovski¹, Raphael Silva¹, Rafael Dorighello Cadamuro¹, Estêvão Brasiliense de Souza¹, Beatriz Savi¹, Aline Viancelli², William Michelin², Deisi Cristina Tápparo³, Helen Treichel⁵, David Rodrigez-Lazaro⁶ and Gislaine Fongaro^{1*}.

- 1 Laboratory of Applied Virology, Department of Microbiology, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.
- 2 Universidade do Contestado (PMPECSA), Concórdia, Santa Catarina, Brazil.
- 3 Western Paraná State University - UNIOESTE/CCET/PGEAGRI, Cascavel, Brazil.
- 4 Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, Brazil.
- 5 Laboratory of Microbiology and Bioprocesses, Federal University of Fronteira Sul, Erechim, RS, Brazil.
- 6 Division of Microbiology, Department of Biotechnology and Food Science, Universidad de Burgos, Burgos Spain.

Abstract: *Salmonella* spp. is highlighted among zoonotic pathogens, as responsible for a large number of infections worldwide. Since the discovery of bacteriophages, they have been applied for different bacterial control, besides that, few environmental phage applications have been investigated. Agricultural-waste samples were used for phage isolation, by the double-agar plate assay. A phage, named SM1, was selected and propagated for application in poultry litter. Two experimental set were performed: (I) Treatment; (II) Re-treatment (re-application of phage SM1 in 6h and 12h). For this, 25g of poultry litter was placed in plastic boxes and contaminated with 10^5 UFC mL⁻¹ of *S. Enteritidis*, in independent duplicates. The litter was treated with 10^6 UFP mL⁻¹ of SM1 phage by dripping. The reduction of *S. Enteritidis* was observed using the XLD agar. Subsequent applications of phage SM1 were able to reduce the bacterial count to zero, being also stable on built up poultry litter.